

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Histologie, embryologie a anatomie

Decelularizace a recelularizace tkání

Decellularization and recellularization of tissues

Mgr. Hana Hrebíková

Školitel: prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, PhD.

Hradec Králové, 2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla věnovat poděkování několika osobám, které se duševně podílely na vzniku a vytváření této práce.

Největší poděkování patří mému školiteli prof. MUDr. Jaroslavu Mokrému, PhD., který mi předával jím dosažené znalosti; který mne povzbuzoval v momentech prvotních neúspěchů; chci poděkovat za jeho trpělivost, podporu, pomoc, rady a připomínky.

Také chci poděkovat celému kolektivu laborantek Ústavu histologie a embryologie, které mi byly oporou v prvních momentech mé histologické praxe.

Poděkování také patří Danielu Diazovi, PhD., který při mne stál během nelehkých začátků se zavedením biochemických metod.

Ráda bych poděkovala celému pracovnímu kolektivu Ústavu lékařské biochemie a Ústavu farmakologie za cenné rady a pomoc, a také za poskytnutí prostorů pro část mé praktické práce.

V neposlední řadě chci poděkovat především svému partnerovi a mé rodině, která mi poskytla potřebné zázemí během studia a kompletování výsledků mé práce.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ	10
2.1 Biomateriály v tkáňovém inženýrství	10
2.2 Extracelulární matrix	12
2.3 Decelularizace	15
2.3.1 Decelularizační agens	15
2.3.2 Metody aplikace decelularizačního agens	21
2.3.3 Evaluace decelularizace	22
2.4 Recelularizace	25
2.4.1 Embryonální kmenové buňky	27
2.4.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSc)	27
2.4.3 Tkáňově specifické kmenové buňky	28
2.4.4 Způsoby recelularizace	28
2.5 Morfologie kosterní svaloviny	32
2.6 Decelularizace kosterní svaloviny	34
2.7 Recelularizace skafoldu kosterní svaloviny	36
3. CÍLE PRÁCE	39
4. MATERIÁL A METODIKA	40
4.1 Pokusná zvířata	40
4.2 Buněčné linie	40
4.2.1 Kultivace C2C12 myoblastů	40
4.2.2 Izolace a kultivace kmenových buněk odvozených od kosterní svaloviny (MDS)	40
4.2.3 Izolace a kultivace myogenních progenitorových buněk	41
4.3 Decelularizace kosterní svaloviny	41
4.4 Morfologická analýza decelularizované kosterní svaloviny	42
4.4.1 Histologické barvicí metody	42
4.4.2 Imunohistochemické hodnocení decelularizované kosterní svaloviny	42
4.4.3 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	43
4.5 Biochemické zhodnocení efektivity decelularizace	43
4.5.1 Western blott	43
4.5.2 Hydroxyprolinová analýza	44
4.5.3 DNA izolace a kvantifikace	44

4.6	Analýza podpory buněčného růstu na decelularizovaném skafoldu	45
4.6.1	Recelularizace decelularizovaného skafoldu pomocí C2C12 myoblastů	45
4.6.2	Recelularizace decelularizovaného skafoldu pomocí kmenových buněk odvozených od kosterní svaloviny (MDSc)	45
4.6.3	Recelularizace decelularizovaného skafoldu pomocí myogenních progenitorových buněk	46
4.7	Implantace decelularizovaných skafoldů do C57Bl/6 myši	46
4.8	Statistická analýza	47
5.	VÝSLEDKY	48
5.1	Morfologické zhodnocení decelularizovaného svalu	48
5.1.1	Histologie	48
5.1.2	Imunohistochemie	52
5.1.3	Elektronová mikroskopie	53
5.2	Biochemická analýza decelularizovaného skafoldu	54
5.2.1	DNA kvantifikace	54
5.2.2	Hydroxyprolinová analýza	55
5.2.3	Western blot	56
5.3	Podpora buněčného růstu na decelularizovaném skafoldu	57
5.3.1	Cytokompatibilita skafoldu s C2C12 myoblasty	57
5.3.2	Cytokompatibilita skafoldu s kmenovými buňkami odvozenými od kosterní svaloviny (MDSc)	59
5.3.3	Cytokompatibilita skafoldu s myogenními progenitorovými buňkami	60
5.4	<i>In vivo</i> implantace skafoldu do vytvořeného defektu na dolní končetině zvířete	61
6.	DISKUZE	67
7.	ZÁVĚR	78
8.	POUŽITÁ LITERATURA	79

POUŽITÉ ZKRATKY

ATP - adenosintrifosfát

bFGF – basic fibroblast growth factor, základní růstový faktor fibroblastů

DAB – 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid hydrát

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenylindol

DMEM – Dulbecovo modifikované Eagle médium

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ECM – extracelulární matrix

EDTA - kyselina ethylendiaminotetraoctová

EGF – epidermal growth factor, epidermální růstový faktor

EGTA – kyselina etylenglykoltetraoctová kyselina

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, enzymová imunoanalýza

ESc – embryonální kmenové buňky

FACS – fluorescence-activated cell sorting, semikvantitativní třídění buněk

FBS – fetální bovinní sérum

FGF – fibroblast growth factor, růstový faktor fibroblastů

FITC – fluorescein isothiokyanát

GAG - glykosaminoglykany

GAPDH – glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza

HBSS – Hank's Balanced Salt Solution, Hanksův roztok

HE – hematoxylin eosin

HPLC – high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

CHAPS - 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfát

iPSc – indukované pluripotentní kmenové buňky

MDS_c – muscle derived stem cells, kmenové buňky odvozené od kosterní svaloviny

MRF – myogenic regulatory factor, faktor regulující myogenezi

MSc – mezenchymální kmenové buňky

PAS – Periodis Acid Schiff, Schiffovo reagens

PBS – phosphate buffer solution, fosfátový pufr

PCNA – proliferating cell nuclear antigen, jadrový antigen proliferujících buněk

PDAB - para-dimethylaminobenzaldehyd

PVDF – polyvinylidenfluorid

PVSc – perivaskulární kmenové buňky

RT-PCR – real time PCR

SB-10/16 - N-Decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfát

SDC – deoxycholát sodný

SDF-1 – stromal-cell derived factor

SDS – dodecyl sulfát sodný

TBS-T – pufovaný solný roztok s Tween 20

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

TFPI – tissue factor pathway inhibitor

TGF- β – transforming growth factor beta, transformující růstový faktor beta

TNF- α – tumor necrosis factor alpha, faktor nádorové nekrózy alfa

VEGF – vascular endothelial growth factor, vaskulární růstový faktor endotelových buněk

WB – Western blot

1. ÚVOD

Rozsáhlejší úrazy kosterní svaloviny jsou spojeny se ztrátou tkáně ve velkém objemu. Automobilové nehody, nádorové onemocnění, válečná poranění jsou nejčastějšími příčinami ztrát svalových a podpůrných tkání. Takto vážná zranění znemožňují podnícení samovolné regenerace, které je kosterní svalovina v omezené míře schopna díky několika faktorům, přičemž jedním z nejdůležitějších je funkce aktivovaných satelitních buněk. Samotná aktivace kmenových buněk má své specifické podmínky, které nejsou splněny u rozsáhlých traumat vzhledem k poškození jejich niché, ovlivňující jejich diferenciaci a sebeobnovu, což vede ve výsledku k významnému snížení regeneračního potenciálu svaloviny a následnou ztrátu funkce. Z těchto důvodů se odvětví tkáňového inženýrství zabývá přípravou biomateriálů, nahrazujících poškozenou svalovou tkáň, a to napodobením jejich struktury. Potenciál stejně jako limity materiálů se odvíjejí od vlastní přípravy nebo původu. Ultrastrukturu syntetických materiálů je možné navrhnout dle morfologie dané tkáně a v kombinaci s vhodnými buněčnými liniemi se tak stávají dobrým zdrojem pro rekonstrukci tkání. Přesto jejich použití s sebou nese nevýhody především z hlediska uvolňování cizorodých látek *in vivo*. Biomateriály přírodního původu mohou být izolovány z tkání a orgánů stejného původu jako je příjemcův; také obsahují stejné prostorové uspořádání, případně niché a růstové faktory využitelné při osazení buňkami s regeneračním potenciálem. Přípravou biomateriálu těchto vlastností se zabývá decelularizace, používající různé přístupy k odstranění buněk z tkání a izolací tkáňově specifické extracelulární matrix. Extracelulární matrix se nachází v okolí buněk a je komplexem složeným především z kolagenu, glykoproteinů a proteoglykanů; je také tkáňově specifická s charakteristickým uspořádáním; ovšem není pouze opornou strukturou, ale je dynamicky zapojena do celkové funkce dané tkáně. Vzhledem k odlišným vlastnostem extracelulární matrix jednotlivých tkání se decelularizační protokoly významně liší ve svých postupech, aby bylo dosaženo maximálně efektivního výsledku. Úspěšnost přípravy biomateriálu se odrazí na vlastnostech produkovaného skafoldu, na jeho cytokompatibilitě a zachování bioaktivních molekul jako jsou například růstové faktory. Díky tomu je následné osazení buňkami, tzv. recelularizace, efektivnější. Přesto příprava funkčního skafoldu je pouze prvním krokem ke znovuobnovení poškozené tkáně či orgánu. Úspěch této mise je také závislý na buňkách, které jsou vybrány pro osazení; na způsobech recelularizace, kdy se využívá statických či dynamických metod; na počtu buněk, případně na kombinaci jednotlivých buněčných linií.

Celý tento komplexní proces řeší moje disertační práce, zabývající se především tvorbou efektivního decelularizačního protokolu, jeho následnou evaluací, a posléze i ověřením získaných dat pomocí recelularizace *in vitro* a *in vivo*.

2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

Tato kapitola je věnována roli tkáňového inženýrství v biomateriálech, shrnuje a vysvětluje důvody užití extracelulární matrix jako materiálu pro regeneraci a rekonstrukci tkání, popisuje principy a možnosti decelularizačních a recelularizačních metod a technik.

2.1 Biomateriály v tkáňovém inženýrství

Tkáňové inženýrství je dynamicky se rozvíjející obor, který využívá buňky, biomateriály a chemické (především růstové) faktory ve vzájemně se prolínajících kombinacích k vytvoření tkáňových náhrad, které mohou pomoci obnově či zcela nahradit poškozenou tkáň nebo orgán. Buňky, sloužící k regeneraci a obnově funkce rekonstruované tkáně, jsou nejčastěji progenitorové nebo v ideálním případě pluripotentní, jejichž největší devizou je vysoký proliferační potenciál a diferenciací v různé buněčné linie. Tyto vlastnosti kmenových buněk se nerozvíjejí, pokud nejsou zasazeny do vhodného prostředí, tzv. niché, které jim může poskytovat biomateriál, podporující jejich adhezi nebo migraci, také uchovává biochemické faktory, je dostatečně porézní pro difúzi živin a naopak pro odvod látek odpadních, a v neposlední řadě musí zachovávat ultrastrukturu dané tkáně a vytvářet mechanicky odolné prostředí pro přítomné buňky.

Biomateriály se dělí do dvou skupin podle toho, jakým způsobem jsou produkovány: syntetické a přírodní. Syntetické materiály jsou velmi rozšířené v tkáňovém inženýrství a nejčastější metodou jejich vzniku je elektrostatické zvlákňování, které vytváří nanovlákná z polymeru za účasti vysokého napětí, přičemž je možné kontrolovat denzitu, porozitu a orientaci těchto vláken (Qazi et al. 2015). Jako základní stavební kámen se nejčastěji používá kolagen, případně polylaktonové, polyglykonové a polykaprolaktonové polymery. Tyto materiály prokázaly vysoký stupeň biodegradace po implantaci, přesto má tato schopnost svá rizika jako je uvolňování kyselin, které se stávají toxickými pro okolní buňky (Berthiaume et al. 2011). Tyto nosiče bývají využívány jako cílené transportéry léčiv nebo buněk, a to díky možnosti modifikace jejich ultrastruktury.

Hydrogely spojují vlastnosti syntetických materiálů a biomateriálů, protože jsou odvozené jak z přírodních, tak ze syntetických materiálů. Díky kombinaci obou složek je možné přírodní materiály chemicky upravovat tak, aby jejich vlastnosti maximálně vyhovovaly daným požadavkům. Alginátová vlákna izolovaná z hnědých mořských řas jsou univerzálním hydrogelem, díky jehož chemická modifikace vzniká porézní materiál s dostatečnou tuhostí a dobrou degradací (Liu et al. 2012). Podobným příkladem hydrogelu je i kyselina hyaluronová, jejíž regenerační účinky byly prokázány při rekonstrukci svalových poškození (Rossi et al. 2011).

Kategorie přírodních materiálů zahrnuje látky, které se fyziologicky nacházejí *in vivo*. Příkladem je extracelulární matrix a její komponenty jako je fibronectin, kolagen, hyaluronan, chitosan, elastin a další (Nissar et al. 2016). Tyto biomateriály jsou přímou součástí tkáně, čímž tvoří specifickou strukturu pro každý typ tkáně, obsahují vazebná místa pro adhezi buněk nebo chemických faktorů, které se významně podílí na změnách buněčného chování a nevytváří imunologickou reakci (Gilbert et al. 2006). Decelularizace je nástrojem přípravy takového biomateriálu a drží se v popředí zájmu tkáňového inženýrství především pro výhody izolace extracelulární matrix (ECM) v podobě, která se blíží ideálnímu složení v nativním stavu. Další nespornou výhodou je možnost použití alogenní matrix jako dárcovského zdroje, protože obsahuje makromolekuly (například kolagen), které jsou evolučně konzervovány a jsou shodné napříč živočišnými druhy (Gilbert et al. 2006). Výsledná matrix je po decelularizaci tvořena komplexem strukturálních a funkčních molekul (kolagen, laminin, fibronectin, glykosaminoglykany, růstové faktory) organizovaných do prostorové sítě specifické pro daný typ tkáně.

Jak už bylo zmíněno výše, tkáňové inženýrství se neomezuje pouze na využití celé extracelulární matrix, ale lze izolovat jednotlivé složky a používat je nejen při rekonstrukcích tkání, ale především jako podporu regenerace. Typickým příkladem je izolace kolagenu typu I používaném jako hydrogel v podobě houbovitě-porézního materiálu či jednolitého filmu. Navíc buňky pěstované na těchto materiálech mají vyšší potenciál zachovat si svůj fenotyp (Urciolo et al. 2013).

2.2 Extracelulární matrix

Extracelulární matrix je reprezentována komplexem proteinů, které poskytují každé tkáni specifickou strukturu a kompozici. Tato prostorová síť má škálu funkcí, které jsou odrazem obsažených komponent. Extracelulární matrix produkují rezidentní buňky, čímž se stává tkáňově specifickou strukturou a určuje její mechanické vlastnosti. Přesto se nedá považovat za zcela intaktní strukturu, ale dynamicky se zapojuje do homeostatických pochodů v tkáni, má vliv na buněčnou proliferaci, migraci, diferenciaci, slouží jako biochemická bariéra a je schopna vázat růstové faktory (Badylak 2015; Ross a Pawlina 2011; Theocharis et al. 2016). Největší část extracelulární matrix zaujímá komplex vláknitých proteinů, jako jsou kolagen, elastin, fibronectin a laminin.

Extracelulární matrix obklopuje buňky a komunikuje s nimi pomocí svých povrchových receptorů, jako jsou například integriny, které ovlivňují a řídí buněčnou sekreci nebo celkově zasahují do buněčného chování (Rozario a DeSimone 2010; Theocharis et al. 2016). Stejnou funkci mají i růstové faktory, cytokiny či chemokiny, které jsou deponovány v ECM a podílejí se tak na biochemických pochodech v celé tkáni či orgánu. Kolagen, proteoglykany i glykoproteiny se také významně zapojují do morfogenetických procesů jako je migrace kardiomyocytů či buněk crista neuralis (Coles et al. 2006; Matsui et al. 2007; Perissinotto et al. 2000; Trinh a Stainier 2004) nebo formování mléčné žlázy, ledvin a plic (Rozario a DeSimone 2010).

Nejvíce zastoupeným proteinem v ECM je kolagen, který je zde obsažený zhruba z 90% suché váhy (Rozario a DeSimone 2010). Podjednotky kolagenních vláken se vzájemně propojují pomocí kovalentních vazeb, díky čemuž jsou kolagenní vlákna velmi pevná v tahu. Protein kolagen měří cca 300 nm a tvoří ho hlava a ocas, které se vzájemně obtáčejí a překrývají. Primární struktura kolagenu se odvíjí od alfa řetězců, které následně podstupují rozsáhlé post-translační modifikace jako je například hydroxylace prolinu nebo oxidace lysinu. Každá třetí aminokyselina tvořící kolagen je glycin, následovaný hydroxyprolinem nebo prolinem. Alfa řetězce kolagenu se posléze stáčí a vytvářejí helikální strukturu (dříve označovanou jako tropokolagen), která se spojuje sacharidovými řetězci, čímž se dá kolagen považovat za součást glykoproteinů, které se vyznačují proteinovým jádrem s navázaným sacharidovým řetězcem (Raspanti et al. 2018). Ultrastruktura kolagenních vláken, studovaná pomocí transmisní elektronové mikroskopie, je tvořena shluky kolagenních vláček, které mají šroubovicovou strukturu. Vlákna obsahují opakující se sekvence příčných proužků, které

vytváří typické žíhání kolagenních fibril. Celkově známe přibližně 28 druhů kolagenů, které vznikají různou konformací alfa řetězců a jsou kódovány různými geny. Nejvíce rozšířeným typem je kolagen typ I, který je všudypřítomný jak v živočišné, tak rostlinné říši; v lidském organismu lze jej nalézt ve šlachách, kde poskytuje odolnost vůči mechanickému zatížení. Právě kolagen typu I je nejčastěji užíván v klinické praxi, a to nejen z autologních nebo alogenních zdrojů, ale možné jej extrahovat také z jiných živočišných druhů (Badylak 2004). Ostatní typy kolagenů jsou také přítomny v ECM, ale v mnohem menší míře a stavba těchto podtypů se přizpůsobuje vyžadované funkci – například kolagen IV, který tvoří síť, má ve své terciární struktuře přítomny trhliny, poskytující určitou flexibilitu a umožňují tak vzájemné propojení vláken mezi sebou (Boudko et al. 2012).

Významnou roli ve vývoji obratlovců hraje dimerický glykoprotein fibronectin (Badylak 2004; Moretti et al. 2007). Tento protein je kódovaný jedním genem a následný splicing jeho mRNA vytváří až 20 různých typů fibronektinu (Pankov a Yamada 2002). Fibronectin se skládá ze dvou podjednotek kovalentně spojených disulfidickou vazbou a ty ve výsledku vytváří jeho vláknitou strukturu. Tato vlákna jsou vzájemně propojena a vytváří tak prostorovou síť, která během embryonálního vývoje obklopuje vyvíjející se tkáň (Davidson et al. 2004). Fibronectin můžeme nalézt i ve formě rozpustné, přičemž tato plazmatická varianta je nejčastěji syntetizována v játrech (Pankov a Yamada 2002). Hlavní funkcí fibronektinu je vazebnost k buňkám, a to prostřednictvím povrchových receptorů, především integrinů (Hynes 2002), proto je často využíván v buněčných kulturách jako adhezivní substrát. Tento protein není omezen jen na vazbu integrinů, ale váže se také na kolagen, fibrin nebo případně na heparan-sulfát (Pankov a Yamada 2002).

Bazální membrána, jakožto součást extracelulární matrix, se skládá z komplexu proteinů, jehož významnou složkou je laminin, dále pak kolagen typ IV, perlekan, nidogeny a agriny (Iorio et al. 2015). Laminin je heterotrimer, tvořený α , β a γ řetězci, přičemž každý řetězec je kódován svým genem (Aumailley et al. 2005). Tento protein je významně zapojený do embryonálního vývoje, a to prostřednictvím jeho vlivu na buněčnou diferenciaci, adhezi, migraci a angiogenezi (Durbeej 2009; Hallmann et al. 2005; Li et al. 2002). Role lamininu v tkáňovém inženýrství spočívá především během procesu re-epitelizace, kdy vytváří substrát například pro keratinocyty epidermis a může ovlivnit jejich motilitu směrem k povrchu, čímž dochází k obnovení krycího epitelu. Laminin také hraje podstatnou roli během angiogeneze, protože se zapojuje do formace tubulárního charakteru cév (Li et al. 2006).

Proteoglykany jsou makromolekulami, skládajícími se z proteinového jádra a negativně nabitých heteropolysacharidů vzájemně spojených kovalentní vazbou. Spojení těchto dvou komponent má v konečném důsledku vliv na výslednou kompozici ECM, která má gelovitou strukturu díky vysokému obsahu vázané vody. Tato struktura napomáhá difúzi ve vodě rozpustných látek, a také zajišťuje jistou tuhost extracelulární matrix, čímž se podílí na tvorbě nosné konstrukce pro buňky. Jejich funkce se ale neomezuje pouze na opornou složku, ale především poskytují vazebná místa pro cytokiny, růstové faktory a chemokiny, což potvrzuje domněnku dynamické reciprocity mezi extracelulární matrix a buňkami. ECM je jejich prostřednictvím zapojena do mechanismů udržování homeostázy, metabolických procesů, koncentraci kyslíku, a díky vazbě růstových faktorů a cytokinů může nepřímo ovlivnit diferenciaci kmenových buněk a napomáhat tak během regenerace (Brown and Badylak 2014; Cortiella et al. 2010; Murry a Keller 2008). Nejvíce prostudovaným zástupcem proteoglykanů je hyaluronan, který se často užívá jako podpůrné médium při rekonstrukci tkání, především v kombinaci s dalšími zástupci proteoglykanů jako je chondroitin, chitosan nebo dextran (Chang et al. 2006; Moller et al. 2007; Muzzarelli et al. 2012). Hyaluronová kyselina je obsažena například ve sklivci, synoviální tekutině, pojivových tkáních a hojně se vyskytuje ve fetálních tkáních (Dicker et al. 2014).

Intaktní extracelulární matrix se neskládá pouze ze strukturálních glykoproteinů a proteoglykanů, ale obsahuje také některé bioaktivní molekuly, jako jsou růstové faktory a cytokiny, které se významně podílejí na modulaci buněčné kinetiky. Růstové faktory se vážou na složky ECM, například kyselina hyaluronová váže FGF (fibroblast growth factor), který významně podporuje proliferaci fibroblastů a endotelových buněk v místě poškození a napomáhá tak hojení rány. Dekorin, jako zástupce glykoproteinů, váže TGF- β (transforming growth factor β). Tento růstový faktor se vyskytuje v několika isoformách, které regulují syntézu ECM a buněčnou proliferaci (Schultz a Wysocki 2009). Pozitivní vliv na angiogenezi má především VEGF (vascular endothelial growth factor), který je esenciálním růstovým faktorem pro endotelové buňky (Harmey 2004). Přítomnost těchto faktorů v extracelulární matrix má pozitivní vliv především na niche kmenových buněk, přesto není dosud známo, jaká je efektivní dávka, případně jakým způsobem by bylo možné tyto faktory aktivovat nebo naopak zcela inhibovat dle potřeby.

2.3 Decelularizace

Celoorgánová decelularizace je jedním z velkých pokroků na poli tkáňového inženýrství a tato technika umožňuje získat extracelulární matrix, zachovávající si strukturu a prostorové uspořádání specifické pro daný typ tkáně nebo orgánu. Kombinací fyzikálních, chemických a biologických agens lze extracelulární matrix připravit tak, že je možné zachovat jak morfologii, tak funkčnost vytvořeného biomateriálu, který je schopen znovuosídlení buňkami. Fyzikální metody, které jsou většinou prvním krokem decelularizace, způsobí lýzu buněčných membrán, která se dokončí chemickými detergenty nebo enzymy specificky narušujícími cytoplazmatický obsah. Buněčné pozůstatky po těchto procesech jsou vyplaveny pufry, což má příznivý vliv na redukci imunologicky aktivních molekul, které by mohly po implantaci biomateriálu vyvolat jeho odvržení na podkladě imunologické odpovědi hostitelského organismu. Promývání extracelulární matrix vytvořené decelularizací (dále nazývané jako skafold), má také vedlejší efekt na vyplavení reziduí decelularizačních agens, které by také mohly mít škodlivý vliv na imunitní systém hostitele.

2.3.1 Decelularizační agens

Efektivita decelularizace se zvyšuje kombinací všech druhů decelularizačních agens, a to fyzikálních, chemických a biologických. Přesto je nutné uzpůsobit volbu decelularizačních agens na základě zvolené tkáně či orgánu, a to vzhledem k buněčnosti tkáně, její kompozici, denzitě, obsahu lipidů nebo tloušťce (Crapo et al. 2011).

2.3.1.1 Fyzikální metody

Teplota

Teplotní vlivy se v decelularizaci využívají jako série zmrazování a rozmrazování tkáně, což vede k tvorbě intracelulárních krystalů, způsobujících narušení cytoplazmatické membrány a vylití obsahu buňky. U této metody decelularizace je nutné sledovat a přizpůsobit změny teploty natolik, aby vytvořené intracelulární krystaly nenarušily stavbu extracelulární matrix, ale omezily se pouze na lytické změny buněk. Tímto způsobem lze připravit skafoldy z chrupavky (Luo et al. 2016), srdeční chlopně (Converse et al. 2012), vazivové tkáně a šlachy (Roberts et al. 1991). Aby došlo k odstranění buněčných reziduí, tkáň se následně proplachuje izotonickými roztoky.

Působení vyššího tlaku

Mechanické působení, jakožto decelularizační agens, nelze použít na buněčné orgány nebo orgány s výraznou denzitou (například játra, slezina atd.), ale je vhodnější pro orgány s tenkou stěnou (střevní stěna, močový měchýř). Krátkodobé vyvíjení hydrostatického tlaku na tkáň či orgány má významný decelularizační efekt především na vaskulární systém, ale dochází k vytváření intracelulárních krystalů z důvodu snižování teploty během vyvíjení tlaku (Gilbert et al. 2006). Tato technika se s výhodou využívá v kombinaci s detergenty, které pronikají do orgánu cestou cévního zásobení. Detergenty proudí krevním řečištěm pod určitým tlakem, který napomáhá průniku agens do všech částí orgánu, čímž se výrazně zvyšuje efektivita procesu (da Palma et al. 2015). Působení tlaku má svůj význam také při produkci práškové varianty extracelulární matrix, která v tkáňovém inženýrství nachází poměrně široké využití (Gilbert et al. 2005).

NTIRE (Non-thermal irreversible electroporation)

Metoda elektroporace pracuje na principu elektrických pulzů, které vyvolávají tvorbu pórů v cytoplazmě na základě destabilizace elektrického potenciálu na jejím povrchu, což vyvolá buněčnou nekrózu (Lee and Kolodney 1987; Lee 2005). Aplikace těchto pulzů má minimální efekt na morfologii a funkčnost extracelulární matrix za předpokladu, že se zabrání přehřívání tkáně či orgánu, způsobující denaturaci proteinů. Přehřívání vzniká v místě aplikace elektrod a je závislé na periodě působení elektrického výboje, na typu decelularizované tkáně, a také na velikosti výboje (Kurata et al. 2014). Ireverzibilní elektroporace je limitována velikostí tkáně či orgánu; navíc je metoda velmi zdoluhavá vzhledem k pomalu probíhající nekróze. Buněčná rezidua je třeba vyplavit z tkáně, aby jejich perzistence, především zbytků jaderného materiálu, nenavodila imunitní odpověď hostitele.

Agitace

Agitace neboli třepání je fyzikální metodou, která se kombinuje s chemickým decelularizačním agens, aby se umožnil lepší prostup agens do tkáně. Vzorek se umístí na orbitální třepačku a jemným třepáním se agens dostává do nitra tkáně nebo se naopak zbytky buněk vyplavují během promývání fyziologickými roztoky. Adekvátní amplituda třepání závisí na typu decelularizované tkáně, její denzitě, kompozici a objemu chemického agens. Tuto metodu lze použít u jakéhokoli typu orgánu či tkáně a vzhledem k nenáročnému přístrojovému vybavení se pro aplikaci decelularizačního agens velmi často používá.

2.3.1.2 Chemická agens

Kyseliny a zásady

Působením kyselin a zásad na biologický materiál dochází k hydrolytické degradaci makromolekul (Crapo et al. 2011), což vede k rozpouštění cytoplazmatických komponent a nukleových kyselin a k celkové degradaci buňky. Často využívanou kyselinou pro decelularizaci tkání je peroctová kyselina v koncentracích okolo 0,1 %, která je dostatečně účinná pro odstranění DNA; navíc vykazuje antimikrobiální schopnosti (Crapo et al. 2011). Pro tyto své vlastnosti nachází uplatnění nejen v decelularizaci, ale také se využívá v potravinářském průmyslu jako dezinfekční a čisticí prostředek. Účinky peroctové kyseliny byly rozsáhle studovány; výsledky prokazují dobrou decelularizační schopnost této kyseliny při odstraňování buněk, a také zachování komponent extracelulární matrix jako jsou například glykosaminoglykany (Hodde et al. 1996). Ovšem její použití neskýtá jen výhody, ale má také nežádoucí účinky jako například úbytku kolagenu, což se následně promítá do snížení stability ECM (Gilbert et al. 2006). Kyseliny se nejčastěji používají pro decelularizaci tkáně malé tloušťky, jako je část stěny močového měchýře nebo tenké střevo.

Zásady, jakožto decelularizační agens, se sice neaplikují tak často jako kyseliny, přesto lze jejich potenciál využít v případě denzních tkání jako je například dermis. Nežádoucí účinky zásaditých decelularizačních agens se projevují především na poklesu obsahu kolagenu v extracelulární matrix, proto se při jejich zařazení do decelularizačního protokolu, výrazně sníží koncentrace a zkrátí se doba působení agens. Zástupci zásaditých decelularizačních agens jsou hydroxid amonný, hydroxid vápenatý nebo hydroxid sodný (Keane et al. 2015).

Hypertonické a hypotonické roztoky

Působení roztoků o rozdílných osmotických koncentracích má vliv na buněčné membrány a vyvolaný osmotický šok způsobí remodelaci chromatinu, zastavení buněčného cyklu, ale také může mít škodlivý efekt na buněčný cytoskelet (Miermont et al. 2013). Hypertonické a hypotonické roztoky se proto nepoužívají jako hlavní decelularizační agens, ale jejich uplatnění spočívá především v přípravě tkáně pro působení enzymatických či jiných chemických agens, které jsou efektivnější v odstranění buněk než hyper/hypotonické roztoky. Jejich největší účinek tkví v narušení cytoplazmatické membrány, ale odstranění dalších buněčných komponent je nedokonalé až téměř nulové. Jako hypotonické roztoky se používají

destilovaná voda, 10mM roztok Trisma base; jako roztoky s vysokou molaritou se aplikují například 1M NaCl, 5 M roztok Trisma base nebo 10 mM EDTA (Gilbert et al. 2006).

Detergenty

Do této kategorie spadají nejčastěji používaná decelularizační agens, a to především díky vysoké efektivitě odstraňování buněk z tkáně. Detergenty jsou amfipatické organické sloučeniny, které mají nepolární hydrofóbní řetězec a polární hydrofilní hlavičku. Ve vodném roztoku tvoří micely, které umožňují tvorbu stabilních vazeb mezi hydrofilními a hydrofóbními sloučeninami v roztoku (Myers 2005). Jejich využití při buněčné lýze spočívá v jejich schopnosti solubilizovat cytoplazmatickou membránu, kdy dochází k integraci detergentů do membrány a při její saturaci dochází k rozpadu membrány. Koncentrace detergentu během decelularizace se pohybuje v rozmezí od 0,1 do 3 % celkového objemu roztoku (Wang et al. 2017; White et al. 2017). Podle obsaženého náboje se dají detergenty dělit do tří skupin: neiontové, iontové a zwitteriontové (obojetné).

Iontové detergenty mají buď kladný, nebo záporný náboj a řadí se mezi velmi silné detergenty. Jejich působením dochází k porušení protein-proteinových vazeb, což vede k denaturaci proteinů, přesto nijak neovlivňuje vazby protein-lipid. Dodecyl sulfát sodný (SDS) je nejznámější a nejrozšířenější agens na poli decelularizace, a to především díky své vysoké efektivitě při narušování cytoplazmatických membrán, DNA a lipidů (Zhou et al. 2010). Toto agens se zaměřuje na narušení kovalentních vazeb mezi proteiny, a proto se také využívá v gelové elektroforéze, kde SDS denaturuje a obalí protein, čímž mu udá stejný náboj a proteiny jsou separovány na základě jejich hmotnosti. SDS je tedy účinným nástrojem pro odstranění proteinů, ale vzhledem k jeho silným denaturačním vlastnostem je potřeba jeho použití náležitě uvážit. Studie, které použily SDS jako decelularizační agens, se liší ve výčtu nežádoucích účinků, jako je snížení hodnoty glykosaminoglykanů v ECM, narušení struktury kolagenu nebo případně znehodnocení růstových faktorů (Reing et al. 2010; Uygun et al. 2010). Nicméně je nutné vyzvednout efektivní odstranění jaderných a cytoplazmatických komponent jako je například intermediární filamentum vimentin (Woods and Gratzer 2005). SDS je často používáno na decelularizaci orgánů s denzní strukturou jako jsou temporomandibulární klouby (Lumpkins et al. 2008), ledviny (Sullivan et al. 2012), játra (Uygun et al. 2010) nebo kosterní svalovina (Zhang et al. 2016). Dalším zástupcem iontových detergentů je deoxycholát sodný (SDC), pracující na stejném principu jako SDS, přesto není natolik účinný, což potvrdily i studie Baigueiry et al. (2010). Účelem studie bylo připravit skafold z trachey, přičemž jako hlavní decelularizační agens v jejich protokolu účinkoval

SDC v koncentraci 4 % po dobu 4 hodin. Efektivní odstranění buněčného materiálu z tkáně vyžadovalo, aby se decelularizační protokol opakoval v 25 cyklech.

Neiontové detergenty jsou látky, které nenesou náboj a jejich denaturační vlastnosti jsou velmi omezené; považují se tedy z hlediska narušení protein-proteinových vazeb za slabé detergenty. Jejich atraktivnost pro použití v decelularizaci tkví v jejich schopnosti degradace protein-lipidových vazeb nebo vazby mezi lipidy. Často se užívají pro izolaci membránových proteinů (Seddon et al. 2004). Triton X-100 je nejrozšířenějším neiontovým detergentem užívaným v decelularizačních protokolech. V porovnání s iontovými detergenty je Triton X-100 vhodný při decelularizaci tkání s nižší denzitou a tloušťkou; je také velmi účinným při odstranění tukové tkáně. Jeho mírné denaturační účinky mají pozitivní vliv na zachování struktury extracelulární matrix, přesto kompletní odstranění cytoplazmatických a jaderných komponent je na nižší úrovni, což bylo prokázáno ve studii Grauss et al. (2003), zabývající se decelularizací srdeční chlopně různými decelularizačními agens, přičemž jedním z nich byl 1 – 5% roztok Tritonu X-100, a výsledkem bylo nulové nebo zcela minimální odstranění jader z tkáně. Jeho vliv na strukturu tkáně také není bez dopadu, protože ovlivňuje obsah glykosaminoglykanů v ECM, případně se podílí na snížení koncentrace glykoproteinů jako je laminin či fibronectin (Grauss et al. 2005). Studie Grausse naopak vykazuje kompletní odstranění buněk z tkáně srdeční chlopně prasete; přestože jejich protokoly pracují se stejnou tkání a se stejnou koncentrací agens (1%), obsahují určité odlišnosti jako například laboratorní teplota versus teplota 37 °C, kterou použila druhá studie. Proto je nutné mít na paměti i tyto drobné nuance a decelularizační protokol „ušít na míru“ danému orgánu či tkáni, kterou chceme použít pro přípravu extracelulární matrix.

Zwiteriontové detergenty spojují vlastnosti iontových a neiontových detergentů, což znamená, že mají nižší denaturační účinek než iontové detergenty a nenesou žádný náboj. Jejich působením zůstává protein v nezměněném stavu a nedochází ke změně jeho náboje. Proto jsou často využívány v 2D elektroforéze (Myers 2005). Konkrétními zástupci těchto detergentů jsou například CHAPS a SB-10/16. Tyto detergenty nejsou při decelularizaci tolik rozšířené jako zástupci iontových a neiontových detergentů, což je způsobeno jejich neefektivním odstraňováním buněčného materiálu z tkání a orgánů, proto se používají v kombinaci s jiným detergentem. Přesto i jejich samostatné užití bylo v literatuře popsáno, a to konkrétně ve studii, která jako hlavní decelularizační agens uvádí roztok CHAPS při decelularizaci krevních cév (Dahl et al. 2003). Použití zwiteriontových detergentů nemá škodlivý vliv na skladbu proteinů v extracelulární matrix, nedochází ke snížení jejich

množství a morfologie ECM je také dobře zachována. Přesto není jejich užití všeobecně rozšířeno především díky nízké efektivitě, týkající se eliminace buněk.

Chelatační činidla jsou schopna na sebe navazovat kovové ionty a odstraňovat je tak z organismu. Hořečnaté a vápenaté ionty jsou esenciální pro buněčné přilnutí ke kolagenu či fibronektinu, konkrétně k receptoru Arg-Gly-Asp (Gailit and Ruoslahti 1988; Klebe 1975). Při použití chelatační činidel, jako je EDTA a EGTA, dochází k vyvázání těchto iontů, a tím se znemožní vazba buněk na proteiny, které jsou součástí extracelulární matrix. Jak EDTA, tak EGTA však nejsou schopny efektivně odstraňovat z tkání buňky, a proto je nutné je používat v kombinaci s enzymatickými decelularizačními agens (Yang et al. 2010) nebo případně s iontovými detergenty (Kang et al. 2017).

2.3.1.3 Biologická agens

Tato kategorie decelularizačních agens zahrnuje enzymy, jako jsou kolagenázy, lipázy, nukleázy, trypsin a další. Jde o skupinu látek, které jsou schopny specificky degradovat komponenty zastoupené z převážné většiny v buňkách, přesto se vyskytují i v ECM, tudíž je jejich použití velmi omezené vzhledem k potenciálnímu poškození struktur skafoldu. Navíc samostatné použití enzymů není žádoucí díky jejich neschopnosti plně eliminovat buněčný materiál z tkání. Přesto jejich kompletní vyloučení z decelularizačního procesu není nasnadě a enzymy se používají jako prvotní agens, které částečně naruší buněčnou strukturu a činí ji tak lépe přístupnou pro hlavní decelularizační agens, což bývá počátečním krokem u tkání s denzní strukturou (Yang et al. 2010). Často užívaným enzymem je trypsin, který specificky štěpí peptidové vazby a je funkční v prostředí s neutrálním až mírně alkalickým pH, ideálně při 37°C. Jak již bylo zmíněno výše, enzymy všeobecně mohou mít neblahý vliv na extracelulární proteiny a právě trypsin může při svém působení poškodit kolagen (Yang et al. 2010), který je nejvíce zastoupeným proteinem ECM a snížení jeho koncentrace koreluje s mechanickou nestabilitou skafoldu. Nukleázy, jakožto další zástupce enzymatických agens, mají schopnost hydrolyzovat fosfodiesterovou vazbu a jsou tak téměř nedílnou součástí decelularizačních protokolů, protože se účastní degradace nukleových kyselin uvolněných při eliminaci buněčného materiálu. Důvod odstranění nukleových kyselin z tkání je prostý; jejich přítomnost ve skafoldu je spojena s vytvořením imunitní reakce hostitelského organismu na implantát a jeho následným odvržením. DNáza/RNáza jsou zástupci endonukleáz a jsou využity na konci decelularizačního protokolu k odstranění nukleových kyselin (Crapo et al. 2011).

Nejlepší možný decelularizační protokol se neomezuje pouze na jednu skupinu decelularizačních agens, nýbrž je kombinuje ve vzájemné kooperaci, čímž zvyšuje efektivitu eliminace buněčného materiálu a naopak snižuje možnost poškození struktury ECM. Volbu konkrétního agens ovlivňuje samotná tkáň či orgán a jejich morfologie.

2.3.2 Metody aplikace decelularizačního agens

Možnosti aplikace decelularizačního agens mají stejnou strategii výběru jako tomu je v případě hledání nejvhodnějšího agens pro odstranění buněk. Je nutné si nejprve uvědomit morfologii a funkci decelularizovaného orgánu, také je potřeba zvážit k jakému účelu bude připravený scaffold sloužit a v neposlední řadě musíme brát v úvahu vlastnosti aplikovaného agens.

Nejrozsáhleji používanou metodou je bezesporu ponoření tkáně do roztoku decelularizačního agens a následné umístění na třepačku, jejíž kývavé pohyby napomáhají vyplavování buněčného materiálu z tkáně. Imerze a následná mechanická agitace se užívají u agens chemických a biologických, proto je možné tuto metodu uplatnit na většinu tkání a existuje velké množství studií, kde byla tato metoda využita; konkrétně pro přípravu scaffoldu z močového měchýře (Meng et al. 2015), plic (Nonaka et al. 2014), srdce (Silva et al. 2016) či kosterní svaloviny (Wassenaar et al. 2015). Rozšířenost této metody je také z důvodu nenáročného přístrojového vybavení, které je možné nalézt ve většině laboratoří. Délka trvání imerze spojené s agitací se odvíjí od typu decelularizované tkáně, také od její tloušťky a denzity, je ovlivněna použitým agens a případně i intenzitou agitace. Kupříkladu tenčí tkáň, jako je močový měchýř, lze decelularizovat v kratším časovém intervalu, oproti komplexnějším orgánům jako jsou ledviny či trachea, kdy je časový interval značně delší. Tato metoda aplikace je vhodná také pro vyplavení decelularizačního agens, což snižuje riziko post-transplantačních rizik, která jsou spojována jak s perzistencí DNA, tak může být vyvolána zbytky agens v tkáni (Gillies et al. 2011). Aplikace agens pomocí imerze a agitace není limitována pouze na agens, ale také se uplatňuje v konečné fázi decelularizačního procesu, kdy se aplikuje izotonický pufr, který promývá decelularizovaný scaffold a odstraňuje již zmiňované zbytky buněčného materiálu nebo případně i pozůstatky decelularizačního agens. Imerze a agitace je metodou využitelnou u orgánů, které jsou denzní a skládají se z několika vrstev.

Využití vaskulárního řečiště pro aplikaci decelularizačního agens je podobně jako imerzní technika vhodnou metodou pro odstranění buněk z celého orgánu. Největší předností celoorgánové perfúze je přítomnost cévního zásobení téměř ve všech orgánech, tudíž jediné omezení skýtá efekt decelularizačního agens na cévní stěnu, případně přístrojové vybavení v podobě perfúzní pumpy. Lyzovaný buněčný materiál lze stejnou cestou vaskulárního řečiště vyplavit z orgánu. Nejznámější studií, která použila celoorgánovou perfúzi, je decelularizace srdce, přičemž Otta et al. (2008) kanyloval aortu potkana a retrogradní perfúzí vpravil do ní 1% SDS a 1% Triton X-100 a výsledkem byl skafold s identickou strukturou jako intaktní srdce ovšem bez přítomnosti buněk. Takto připravený skafold byl osídlen kardiomyocyty, čímž se prokázala cytokompatibilita. Recelularizovaný skafold dokonce vykazoval částečnou kontraktilitu. V poslední době se některé vědecké skupiny zaměřují na perfúzní decelularizaci plic s využitím dvou přístupových cest pro aplikaci agens: cévní řečiště a dýchací trubici. Konkrétní případ decelularizace plic uvedla vědecká skupina pod vedením Gilpina et al. (2014), kteří porovnávali tři agens (SDS, SDC a CHAPS) aplikovaná perfúzně. Decelularizovaný skafold si zachoval strukturu plic, buňky byly úspěšně eliminovány a vyplaveny z orgánu, a také došlo k zachování základních komponent ECM, jako jsou glykosaminoglykany, kolagen a elastická vlákna.

Předchozí dva popsané postupy představují nejčastější varianty aplikace decelularizačního agens do orgánu, přesto literatura popisuje i další způsoby jako je například působení vyššího tlaku nebo superkritické tekutiny. Působení vyššího tlaku zlepší prostup decelularizačního agens do orgánu nebo ji lze použít samostatně jako metodu odstranění buněk.

2.3.3 Evaluace decelularizace

Decelularizovaná tkáň či orgán jsou významným zdrojem extracelulární matrix, přesto aby bylo možné nadále pracovat s tímto materiálem, je nutné jej podrobit řadě testů, které odhalí zachování základních komponent. Jestliže by došlo k vážnému poškození morfologie či funkce ECM, nelze ji uplatnit v rekonstrukci tkání a orgánů. Série testů zkoumajících efektivitu decelularizace především analyzuje je skafold prost buněčného materiálu, jehož persistence způsobí rejekci implantátu, případně výrazně znesnadní adhezi buněk *in vitro* a *in vivo*.

Mezi základní techniky používané pro zhodnocení efektivity decelularizace se používají metody zkoumající tkáň z hlediska zachované mikroskopické struktury (histologie, elektronová mikroskopie, imunohistochemie), metody kvantitativní (hydroxyprolinová analýza, kvantifikace DNA, glykosaminoglykanů, růstových faktorů, proteomika), metody hodnotící decelularizovanou tkáň dle zachované mechanické odolnosti (mechanické testování síly v tahu, odolnost vůči hydrostatickému tlaku), techniky zabývající se vztahem buněk a skafoldu (cytotoxicita, buněčná proliferace a metabolismus, recelularizace *in vitro* a *in vivo*).

Nejčastější metodou hodnocení efektivity odstranění buněk je standardní histologické barvení, hematoxylin eosin. Toto přehledové barvení umožňuje inspekci decelularizované tkáně a je prvním hodnotícím krokem při evaluaci. Tkáň nativní bude obsahovat všechny struktury typické pro danou tkáň, kdežto v případě decelularizované tkáně je možné pozorovat pouze extracelulární matrix, tudíž nejčastěji velké množství vazivových vláken, případně zbytky amorfni hmoty, „skelet“ cévního a nervového zásobení. Všechny tyto komponenty jsou, v případě efektivní decelularizace, uspořádány prostorově ve stejné matici, jako je tomu ve fyziologickém stavu. V histologických technikách se využívá velká škála barvicích metod, které mohou být namířeny na specifické komponenty extracelulární matrix; příkladem jsou specifická barvení pro kolagenní vlákna (Massonovy trichromy, barvení siriovou červení, Weigert van Giesonovo barvení), elastická vlákna (orcein, aldehydový fuchsin, resorcin-fuchsin), retikulární vlákna (Gömöriho impregnace stříbrem), bazální membránu (PAS metoda, Jonesova impregnace), glykosaminoglykany (alciánová modř).

Imunohistochemie je spojovacím článkem mezi histologickými a biochemickými metodami, protože při této metodě se prokazuje zachování komponent souvisejících s morfologií tkáně či orgánu. Na podobném principu pracuje i Western blot, ale ve srovnání s imunohistochemií, je citlivější metodou, a navíc ji lze použít k semi-kvantitativnímu stanovení proteinů (Taylor et al. 2013).

Jednou ze základních metod evaluace decelularizace je kvantifikace DNA. Na základě mnoha studií se stanovila hraniční koncentrace DNA, jejíž množství ve skafoldu nezpůsobí rejekci po jeho implantaci do hostitelova organismu (Nagata et al. 2010; Zheng et al. 2005). Prahová hodnota množství dsDNA ve skafoldu je méně než 50 ng DNA na 1 mg decelularizované tkáně v suchém stavu. Tato hodnota se může případně lišit u některých tkání, přesto je stále používána jako nepsaný standard pro efektivní decelularizaci. Dalšími kritérii, které se spojují s termínem úspěšné eliminace buněk z tkáně, jsou nálezy fragmentů DNA kratších než 200 bp a absence buněčného materiálu ve skafoldu po jeho obarvení

hematoxylin eosinem nebo DAPI barvením (Crapo et al. 2011). Kvantifikace DNA se provádí pomocí interkalačních činidel jako je PicoGreen nebo například propidium jodid.

Ultrastrukturu skafoldu lze nejlépe vyšetřit pomocí transmisní elektronové mikroskopie, přičemž obě varianty, skenovací a transmisní, se používají. Elektronová mikroskopie umožňuje pozorování jednotlivých komponent na jejich submikroskopické úrovni, je vhodnou metodou pro zhodnocení neporušenosti bazální laminy, kolagenních mikrofibril, absenci organel. Touto cestou je také možné porovnat morfologii nativní tkáně versus decelularizované.

Stanovení objemové nebo hmotnostní koncentrace jednotlivých komponent extracelulární matrix je doménou biochemických metod, které umožňují kvantifikovat například kolagen hydroxyprolinovou analýzou (Hill et al. 2015), spektrofotometrickým zhodnocením pomocí siriové červeně (Kliment et al. 2011), HPLC (Pataridis et al. 2009), Sircol analýzou (Lareu et al. 2010) a dalšími, které se zakládají především na změně vlnové délky závislé na koncentraci obsaženého kolagenu ve vzorku; laminin pomocí ELISA testů (Li et al. 2012), Western blotem (Lea et al. 2016); koncentrace glykosaminoglykanů se stanovuje pomocí HPLC (Studelska et al. 2006); spektrofotometrickou analýzou se kvantifikují proteoglykany (Afara et al. 2013) a pomocí ELISA testů se měří koncentrace růstových faktorů (Caralt et al. 2015).

Mimo posuzování morfologických charakteristik decelularizovaného skafoldu, se také zkoumají biologické vztahy skafoldu s recelularizovanými buňkami, a to především migrace buněk do skafoldu (Hřebíková et al. 2017; Schmitt et al. 2013). Efektivita recelularizace skafoldu se nejčastěji hodnotí pomocí histologických technik, a to standardním barvením hematoxylin eosinem. Jestliže buňky jsou ochotny migrovat do skafoldu, prokáže se tímto i biokompatibilita, která se studuje také jeho implanta do živého organismu (Guan et al. 2015; Zhang et al. 2016). Nepřímo se také sleduje vznik zánětlivé reakce, jejíž příčinou může být přítomnost cizorodé DNA (Lin et al. 2014). Mimoto se také hodnotí buněčná viabilita buněk, jejich metabolismus, případně proliferace, a to pomocí biochemických metod (Caralt et al. 2015).

2.4 Recelularizace

Recelularizace je definována jako buněčné osídlení decelularizované tkáně nebo orgánu. Přestože recelularizace a decelularizace jsou dva protipóly, tak obě tyto kategorie spojuje komplexnost celého procesu. Recelularizace není přímočaré osazení skafoldu buňkami, ale je nutné respektovat původní tkáň, musí se transplantovat dostatečné množství buněk, které mají proliferační a regenerační potenciál, proto se tak často nepoužívají buňky vyzrálé s omezenou kapacitou proliferace. Na skafold se může aplikovat více buněčných populací, které zajistí obnovení jak funkčního charakteru tkáně či orgánu, tak rekonstrukci cévního zásobení a podpůrné složky tkáně nebo orgánu.

Výběr vhodné buněčné populace je klíčovým krokem recelularizace stejně jako se volba správné metody pro transplantaci buněk do skafoldu, která napomáhá jejich nativní distribuci. Nejvhodnějšími kandidáty pro recelularizaci jsou bezesporu kmenové buňky vzhledem ke svým typickým vlastnostem jako je schopnost sebeobnovy, vysokému proliferačnímu a diferenciačnímu potenciálu a plasticitě. Kmenové buňky užívané v tkáňovém inženýrství se dají rozčlenit do několika kategorií dle svých vlastností, a to na embryonální kmenové (ES) buňky, fetální buňky, tkáňově specifické kmenové buňky a indukované pluripotentní kmenové buňky (Badyalak et al. 2011).

Buňky využívané pro recelularizaci je potřeba redistribuovat v tkáni či orgánu tak, aby se dosáhlo původního buněčného složení tkáně či orgánu. Typ buněk se liší orgán od orgánu, přesto je možné obecně rozdělit tyto buňky do dvou kategorií: na buňky obnovující parenchym, tedy buňky navracející funkci orgánu, a buňky stromální, které syntetizují extracelulární matrix. Esenciální buněčnou linií pro recelularizaci skafoldu jsou bezesporu endotelové buňky, zajišťující obnovu vaskulárního řečiště, jež je významnou složkou pro obnovení funkčního stavu rekonstruovaného orgánu. Endotelové buňky mimo jiné vytvářejí antitrombogenní prostředí, protože produkují látky jako trombomodulin, TFPI (tissue factor pathway inhibitor) a podílí se na tvorbě oxidu dusnatého a prostacyklinu, které přirozeně potlačují shlukování krevních destiček (Yau et al. 2015). Transplantace endotelových buněk do decelularizovaného skafoldu se již realizovala na orgánech, jako jsou plíce (Petersen et al. 2010) nebo kůže (Menon et al. 2003).

Množství použitých buněk se opět odvíjí od typu rekonstruovaného orgánu vzhledem k odlišným mechanickým a funkčním nárokům. Například metabolicky velmi aktivní orgány, jako jsou například játra, je možné nahradit pouze z 10 % celkového objemu, což je

10^{10} buněk pro lidský model jater. Naproti tomu kdybychom nahradili zcela poškozenou svalovinu srdce pouze z 10 % celkového objemu, nebylo by možné pozorovat zlepšení funkce či regeneraci orgánu. Srdce je nutné osadit buňkami v téměř plném počtu, jako je tomu u srdce nativního, aby bylo plně funkční (Vunjak-Novakovic et al. 2010).

Kmenové buňky lze izolovat od stejného jedince nebo je možné použít alogenní buňky. Výhodou autologních buněk je absence imunitní odpovědi, proto nemusí být příjemcův organismus zatěžován vysokými dávkami imunosupresiv, také se snižují náklady na léčbu a nedochází tak často k infekcím. Ale i tyto buňky mají své nevýhody, které jsou patrné z jejich nesnadné izolace z organismu, a také nižší výtěžnosti při izolaci. Mesenchymální kmenové buňky se používají pro klinické účely, konkrétně při terapii infarktu myokardu (Amado et al. 2005; Kawada et al. 2004), při léčbě reakce štěpu proti hostiteli (Le Blanc et al. 2004; Prasad et al. 2011) nebo diabetu (Lu et al. 2011). Buňky z alogenního zdroje tyto nevýhody postrádají, protože se izolují ve větších množstvích z jedinců s lepším zdravotním stavem a nižším věkem; často také ochotněji prolifерují a snadněji se modifikují tak, aby maximálně vyhovovaly kladeným požadavkům. Navíc nebývají tak náchylné k variabilitám v jejich diferenciaci. Přesto jejich užití není spojováno pouze s výhodami, ale jejich nežádoucí účinky se projevují při vyvolání imunitní odpovědi, také hrozí riziko kontaminace vzorku, případně vnesení cizorodých agens do organismu hostitele (čínidlo, chemický prostředek, biologické agens). Podobně jako tomu je u autologních transplantací, se u alogenních případů používají buňky kostní dřeně, nebo je také zdokumentován případ allogenní transplantace fibroblastů (Sher et al. 1983).

Ovšem tyto kroky jsou pouze začátkem výzvy, kterou rekonstrukce tkání a orgánů bezesporu je. Kmenové buňky se v tkáních nacházejí ve specifických lokacích, které podporují a regulují jejich produkci. Kombinací vhodného prostředí s adekvátními růstovými faktory, dostáváme tzv. niché, což je specifické mikroprostředí obsahující bioaktivní molekuly (buněčné signály, růstové faktory) a jejich hlavní funkci je podpora buněčného růstu, diferenciaci a ochrana buněk před vnějšími vlivy (Jones and Wagers 2008). Ideální decelularizovaná tkáň poskytuje toto niché, čímž se takto vytvořený scaffold stává místem výskytu bioaktivních molekul. I přesto se scaffoldy modifikují přidáním růstových faktorů, jako například VEGF (Zhou et al. 2013), EGF (Su et al. 2014), bFGF (Lin et al. 2017) nebo TGFβ-3 (Cunniffe et al. 2015).

2.4.1 Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové (ES) buňky mají pluripotentní charakter, což jim umožňuje transformovat se do jakékoliv buňky v organismu. Také mají vysoký proliferační potenciál, aniž by docházelo u mateřské pluripotentní buňky k senescenci. Navíc tyto buňky netrpí genomovou modifikací typickou pro vyzrálější buněčné linie (například progenitorové buňky) a jsou tak vnímavější vůči prostředí, do něhož jsou vsazeny a jejich vývoj je lépe směřovatelný do předurčených specifických linií (Badylak et al. 2011). Terapie ES buňkami není obvyklým přístupem léčby onemocnění, proto je limitovaný počet klinických studií, zabývajících se použitím těchto buněk. První klinickou studií, zabývajících se použitím lidských ES buněk v terapii srdečních chorob, byla od skupiny Menasché et al. (2015), kteří pluripotentní buňky diferencovali v kardiomyocyty a následně transplantovali pacientům se srdečním selháním. Na tyto výsledky v pozdějších letech navázala stejná skupina Menasché et al. (2018), která dokumentovala transplantaci lidských ES buněk diferencovaných v kardiomyocytární progenitorovou linii u pacientů s dysfunkcí levé předsíně. I přes velmi dobré výsledky těchto studií se s užitím ESc vážou jisté nevýhody jako je etické hledisko, jejich alogenní použití a riziko tvorby teratomů při jejich transplantaci v pluripotentním stádiu (Lees et al. 2007; Nussbaum et al. 2007). Právě nesnadná izolace a etické hledisko nasměrovali vývoj k jinému buněčnému zdroji se stejnými vlastnostmi jako ESc, a to indukovaným pluripotentním kmenovým buňkám (iPSc).

2.4.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSc)

Objev transformace adultních buněk v pluripotentní buňky působením transkripčních faktorů byl obrovským úspěchem na poli výzkumu a využití kmenových buněk. V roce 2006 Takahashi a Yamanaka (2006) vytvořili protokol, umožňující dediferenciaci vyzrálých buněk pomocí retrovirů exprimujících transkripční faktory Oct4, Sox2, c-Myc a Klf4, umožňujících přeměnu myšího fibroblastu v pluripotentní buňku. Využitím tohoto postupu se vyřešilo hned několik nevýhod, spojených s užitím ESc, a to neporušení etického hlediska, buňky jsou autologní a jejich expanze probíhá *in vitro*, čímž se staly vynikajícím zdrojem buněk pro tkáňové inženýrství. Ovšem i použití iPS buněk není zcela bez nevýhod; jejich slabinou je epigenetická modifikace, která není přítomna u ES buněk. Indukované pluripotentní kmenové buňky mohou mít díky této vlastnosti pozměněnou genetickou expresi, stejně jako buňky

diferencované ze stejné linie (Maherali et al. 2007). Podobně jako při transplantaci ES buněk i u iPS buňky vzniká riziko tvorby teratomů v případě, že jsou transplantovány v indiferentním stádiu. I přesto jsou ceněným buněčným zdrojem pro tkáňové inženýrství a již se vyskytly studie, které využily iPSc ke znovuosídlení zvířecího skafoldu (Carvalho et al. 2012; Lu et al. 2013).

2.4.3 Tkáňově specifické kmenové buňky

Tkáňově specifické kmenové buňky tvoří základ jednotlivých tkání a v hierarchii kmenových buněk se nachází nejnižší. Ve srovnání s ESc a iPSc jsou výrazně limitovány v možnosti proliferace a diferenciace a nemohou z nich vznikat komplexní tkáně, ale pouze její součásti. Nejčastějším používaným typem jsou kmenové buňky kostní dřeně, tukové tkáně, kosterní svaloviny či buňky pupečnickové krve (Ballen 2017; Fikry et al. 2016; Frese et al. 2016; Sambasivan a Tajbakhsh 2015). Buňky kostní dřeně se využívají v mnoha klinických pokusech, a to při terapii onemocnění akutního charakteru jako je infarkt myokardu (Strauer et al. 2002) nebo u chronických chorob jako je osteonekróza (Gangji et al. 2011) nebo chronické myeloidní leukémie (Sehn et al. 1999). Mezenchymální kmenové buňky izolované z kostní dřeně se diferencují ve stromální nebo funkční složky orgánů jako je kosterní svalovina, kost nebo případně endotelové buňky a myocyty hladké svaloviny, kdy obě tyto linie dokáží rekonstruovat cévní zásobení. Snadná izolace a dobrá výtěžnost při expanzi těchto buněk je velkým pozitivem tohoto typu buněk, které nacházejí uplatnění v klinické praxi.

2.4.4 Způsoby recelularizace

Metody recelularizace jsou dvojího druhu, a to statická a dynamická recelularizace, přičemž statická decelularizace se charakterizuje jako vpravení buněk do skafoldu a dynamická recelularizace zapojuje vnější metody osázení jako je perfúze, bioreaktory nebo magnety (Rana et al. 2015). Vzhledem k vyšší efektivitě se častěji používají metody dynamické recelularizace. Jako ideální využití injekčního vpravení buněk do skafoldu je metoda perfúzní, která je efektivnější z hlediska uniformní distribuce buněk v orgánu. Studie, zabývající se decelularizací a recelularizací potkaního srdce (Robertson et al. 2014),

porovnávala efektivitu perfúze buněk, a to hned 3 cestami: přímý vstřik buněk do aorty, vpravení buněk cestou a. brachiocephalica a kombinaci žilního (v. cava inferior) a tepenného cévního zásobení (a. brachiocephalica). Pro osídlení si tato vědecká skupina zvolila potkaní aortální endotelové buňky a neonatální potkaní kardiomyocyty. Jako nejlepší přístupovou cestou se ukázala kombinace arteriálního a venózního řečiště, a také došlo k obnovení kontraktility myokardu. Dalším příkladem využití cévního řečiště byla decelularizace a recelularizace jater (Uygun et al. 2010), kdy se buňky transplantovaly čtyřmi vpichy do portálního řečiště, a to v počtu cca 20 % celkové hmotnosti buněk jater potkana. I takto malé množství buněk ovšem dokázalo obnovit buněčnou populaci jater z 95 %. Ovšem perfúzní recelularizace skýtá jistá negativa, a to především vystavení skafoldu opakovanému mechanickému tlaku způsobenému kolujícím perfuzátem, které se může promítnout na jeho morfologii, případně může poškodit buňky. Dalším limitem této metody je koncentrace buněk, kdy při příliš vysokém počtu buněk hrozí nebezpečí tvorby agregátů, které poté podléhají nekróze.

Dynamická recelularizace není pouze otázkou osazení skafoldu buňkami pomocí perfúze, ale existují i jiné alternativní postupy, které zahrnují například použití magnetických částic nebo bioreaktor. Příkladem použití magnetických částic, které mají zvýšit efektivitu recelularizace je studie Shimizu et al. (2007), který použil k osídlení decelularizované a. carotis communis NIH/3T3 fibroblasty, buňky hladké svaloviny a lidské kožní fibroblasty. Jednotlivé buněčné kultury obsahovaly magneticky označené lipozomy, které do buňky pronikají na podkladě elektrostatické interakce s negativním nábojem na povrchu buňky. Úspěšnost recelularizace byla 99% v případě použití magnetu a pouze 13% úspěšnost vykazovala metoda bez magnetu. Přesto vystává otázka toxicity lipozomů, které mohou svou přítomností zpomalovat růst (Ito et al. 2004), a také není zcela znám způsob vyloučení lipozomů z buňky.

Bioreaktor je modifikací perfúzní recelularizace, přičemž vytváří podmínky velmi blízké *in vivo* podmínkám. Srdcem tohoto přístroje je perfúzní pumpa, která vytváří kontinuální průtok média rekonstruovaným orgánem a zvyšuje tak efektivitu homogenní distribuce buněk v orgánu. Rychlost průtoku musí být upravena vzhledem k vlastnostem a morfologii orgánu, aby nedocházelo k poškození struktur vlivem příliš vysoké rychlosti průtoku (Park et al. 2008). Velmi důležitou součástí bioreaktoru je oxygenátor, který se stará o dostatečné okysličení recelularizovaného orgánu; jeho přítomnost je zásadní u orgánů, které ještě nemají vytvořené funkční kapilární řečiště. Oxygenátor produkuje jak kyslík, tak oxid

uhličitý, který se stará o udržování pH. Funkce bioreaktoru není omezena pouze na perfúzi, ale umožňuje vystavovat progenitorové buňky biomechanickým stimulům, které nastartují jejich diferenciaci. Typickým příkladem jsou endotelové buňky, které se uspořádají tak, aby byly ve směru toku (Lovett et al. 2009). Vnější stimuly mohou také ovlivnit adultní kmenové buňky myokardu, které po se po implantaci do skafoldu srdce vystaví elektrickým stimulům a navodí tak synchronizovanou kontrakci (Bursac et al. 2007). Podobným způsobem se ovlivňuje rekonstruovaná plicní tkáň, která se vystavuje mechanické ventilaci, což má pozitivní vliv na vývoj alveolů, proliferaci a diferenciaci epitelu dýchacích cest (Petersen et al. 2010).

Druhým možným způsobem je pasivní recelularizace, tedy kultivace skafoldu *in vitro* s buňkami jedné nebo vícera populací. Ovšem tato metoda má velmi nízkou úspěšnost, a proto se kombinuje s recelularizací pomocí injekčního vpichu. Výhodou je přesná topografie místa vpichu, a tím lepší kontrola místa pro osazení buňkami. Tato výhoda se může stát také nevýhodou u skafoldů malých zvířat, kde hrozí riziko potenciálního poškození struktury nepřesným vpichem.

Přestože je tematika recelularizace celých orgánů prostudována velmi podrobně, neustále se vynořují nové výzvy pro vytvoření funkčního orgánu. Překážek je mnoho, například nativní prostorová distribuce buněk, vzájemná interakce mezi buňkami, dostatečná denzita a počet transplantovaných buněk, funkční revaskularizace tkáňového skafoldu a mnoho dalších, které se odkrývají s dalšími poznatky v tomto odvětví. Navzdory tomu se již objevily studie, které použily rekonstruované orgány v klinické praxi. Příkladem je transplantace recelularizované průdušnice (Macchiarini et al. 2008). Takto připravená trachea byla osídlena buňkami příjemce (epitelové buňky bronchu a chondrocyty) a skafold se umístil společně s buněčnou kulturou do bioreaktoru po dobu 96 hodin. Transplantace proběhla úspěšně a kontrolní výsledky po 4 měsících po operaci vykazovaly dobré začlenění transplantátu, a to bez použití imunosupresivní léčby vzhledem k použití autologních buněk. I po pěti letech byl transplantát funkční, přestože v blízkosti průdušnice se vytvořilo pooperační zjizvení tkáně. Ovšem tento postup není možné použít pro pacienty s urgentní potřebou transplantace, protože celková doba produkce přesáhla 6 týdnů. Zrychlení procesu přípravy skafoldu pro implantaci dosáhla jiná vědecká skupina (Elliott et al. 2012), jejichž experiment se týkal transplantace recelularizované průdušnice osídlené mezenchymálními kmenovými buňkami a autologními buňkami respiračního epitelu; pro podporu chondrogenese a angiogeneze se podával lidský erythropoetin a TGF- β . Transplantát byl po

týdnu po operaci plně revaskularizován a v jeho okolí byla silnější infiltrace neutrofilů. Po dvou letech inspekce transplantátu se potvrdila jeho funkčnost.

Ovšem nejen recelularizované skafoldy nacházejí své upotřebení v klinické praxi. Nepoměrně delší dobu se pro regeneraci poškozených tkání a orgánů používají decelularizované tkáně. Jedním z příkladů je MatrACELL, což je extrahovaná lidská ECM, která se používá při ortopedických operacích, kranio-maxilárních nápravách a hlavně při rekonstrukcích měkkých tkání, a také pomáhá při hojení chronických i akutních ran (Moore et al. 2015). MatrACELL se snadno začleňuje do okolních tkání, po cca 30 dnech dochází k vaskularizaci a samovolné recelularizaci *in vivo*, po operaci se vytváří menší jizva. Dalším dokumentovaným příkladem použití decelularizovaného skafoldu v praxi je náhrada poloměsíčitě chlopně (Cebotari et al. 2011) izolované z lidského kadaveru. Takto připravená chlopeň byla transplantována 38 pacientům, kteří byli sledováni po dobu pěti let. Průběžné kontroly odhalily, že nedošlo ani k jednomu úmrtí spojenému s dysfunkcí nebo jakýmkoliv poškozením voperované chlopně; všechny chlopně se recelularizovaly autologními buňkami pacientů, nevykazovaly známky kalcifikace a jejich mechanická odolnost byla srovnatelná s nativními chlopněmi.

Překážky, které musí obor tkáňového inženýrství řešit, se objevují téměř na každém kroku při rekonstrukci tkání a orgánu. Samotná příprava dostatečně biokompatibilního materiálu je stálou výzvou, a přestože se mnohé studie blíží k ideálnímu výsledku, tak vyvstávají další otázky, jako například kolik buněk je potřeba pro vytvoření autonomního orgánu s obnovenými funkcemi a morfologií? Jak je dopravit na jejich místo? Jaký typ kmenových buněk použít a v jakém stádiu? Je možné kontrolovat jejich diferenciaci? Všechny buněčné typy mají svá pozitiva, která ale nejsou bez limitů či případných nežádoucích účinků. Tkáňově specifické kmenové buňky jsou skvělým nástrojem pro obnovení menších tkáňových a orgánových defektů, jsou snadno izolovatelné, proto je možné použít autologní buňky. Přesto jsou limitovány proliferační a diferenciační kapacitou, snáze podléhají senescenci než embryonální a indukované pluripotentní kmenové buňky. Ovšem tyto buňky nejsou zcela bez vady vzhledem k jejich nekontrolovatelné diferenciaci a sklonu k tvorbě teratomů. Jak již bylo řečeno dříve, recelularizace je velmi komplexní, a proto je potřeba na ni takto pohlížet.

2.5 Morfologie kosterní svaloviny

Základní stavební jednotkou kosterní svalové tkáně je svalové vlákno, vznikající během jejího vývoje splynutím myoblastů. Takto vytvořené svalové vlákno obsahuje ve své sarkoplazmě velké množství jader lokalizovaných na periferii těsně pod sarkolemou. Sarkoplasma mimo jádra obsahuje sarkoplazmatické retikulum, mitochondrie a běžnou organelovou výbavu. Ovšem nejdůležitější komponentou sarkoplazmy jsou myofibrily, skládající se z menších úseků, sarkomer, které vznikají specifickým prostorovým uspořádáním myofilament.

Myofilamenta, jakožto kontraktilní elementy, jsou dvojího druhu: aktin a myozin, přičemž jejich odlišná tloušťka společně s jejich pravidelným střídáním vytváří dojem žhání. Tlustá filamenta tvoří pouze myosin, skládající se ze dvou polypeptidů, lehkého a těžkého řetězce, kdy těžký řetězec vybíhá v hlavičku. Tato hlavička obsahuje dvě vazebná místa, jedno pro ATP a druhé pro aktin. Tenká filamenta tvoří pouze aktin, ale přikládají se k nim další struktury jako je troponin a tropomyosin, které se spojují v troponin-tropomyosinový komplex, překrývající vazebné místo pro myosin během stavu svalové relaxace.

Sarkoplazmatické retikulum vytváří síť těsně obklopující myofibrily. Jedna tato organela sahá od A úseku až po I úsek jedné sarkomery. V místě kontaktu dvou sarkoplazmatických retikul se vytváří terminální cisterny, které slouží jako rezervoár pro uchovávání vápenatých iontů nezbytných pro svalovou kontrakci, protože se vážou na troponin-tropomyosinový komplex, a tím se odhalí vazebné místo aktinu pro myosin. Mezi dvě terminální cisterny se vchlipuje sarkolema a tvoří T tubulus, který umožňuje rychlé vedení depolarizace vyvolané uvolněním neurotransmiteru z motorické ploténky. T tubulus tímto způsobem zvýší propustnost terminálních cisteren a dochází k uvolnění vápenatých iontů do sarkoplazmy. Vzhledem k energetické náročnosti celého procesu kontrakce se v sarkoplazmě hojně vyskytují mitochondrie, dodávající ATP.

Svalová vlákna mají bohaté nervové zásobení zajišťované motorickými neurony, které jsou v kontaktu se sarkolemou svalového vlákna prostřednictvím motorické ploténky. Synaptické váčky terminální části axonu neuronu obsahují neurotransmitter acetylcholin, který se váže na acetylcholinové receptory sarkolemy, která je v místě motorické ploténky výrazně zprohýbaná. Navázáním acetylcholinu dochází ke zvýšení propustnosti sarkolemy pro sodík, čímž dojde ke změně náboje a sarkolema se depolarizuje, což má za následek výše uvedené

procesy. Jediný neuron může inervovat menší či větší počty svalových vláken, přičemž svaly, zajišťující jemnou motoriku, obsahují menší počet svalových vláken inervovaných jednou motorickou jednotkou.

Povrch svalového vlákna je krytý vrstvou řídkého kolagenního vaziva, endomyzia, které s obsaženým cévním zásobením poskytuje kosterní svalovině dostatečný přísun kyslíku a živin potřebných pro pokrytí metabolicky náročného procesu. Svalová vlákna se spojují do většího celku, svazku, které má na svém povrchu perimyrium. Celý sval jakožto orgán je kryt fascií, hustým kolagenním vazivem, které se připojuje k samotné svalovině pomocí epimyzia.

Kosterní svalovina vzniká během embryonálního vývoje z intraembryonálního mezodermu, konkrétně z paraaxiálního mezodermu, který se člení v somity (dermomyotom a skelerotom). Dermomyotom se dále člení na epaxiální a hypaxiální část, přičemž epaxiální dermomyotom je základem pro formování hlubokých svalů zad; naproti tomu hypaxiální dermomyotom je důležitým zdrojem pro tvorbu svalů končetin a hrudníku. Svaly kraniofaciální oblasti jsou pak tvořeny přímo z paraaxiálního mezodermu. Signální dráhy specifických transkripčních faktorů, jako jsou MyoD a Myf5, hrají zásadní roli v diferenciaci kosterní svaloviny. Během embryonálního vývoje dochází k fúzi myoblastů, vytváří se myotuby a formují se primární svalová vlákna; následně se morfologicky definuje sarkolema na povrchu svalových vláken a lze pozorovat vznik satelitních buněk, které se nachází mezi sarkolemou a laminou externou svalového vlákna (Cossu a Biressi 2005). Satelitní buňky jsou klidové kmenové buňky, účastníci se regenerace kosterní svaloviny postnatálně.

Tyto kmenové buňky mohou být aktivovány při poškození svalového vlákna a dochází k jejich proliferaci a migraci na místo potřeby. Zde dochází k jejich splnutí a tvorbě myotub, které se následně diferencují ve svalová vlákna. Celý proces je řízen, z molekulárního hlediska, přes transkripční faktory Myf5, MyoD a MRF (Charge and Rudnicki 2004). Ovšem v místě poškození se nevyskytují jen pro-myogenní buněčné populace, ale také fibroblasty a buňky zánětlivé reakce jako jsou neutrofilní granulocyty a makrofágy. Tyto buňky mají za úkol fagocytovat zbytky svalových vláken, a také mohou účinkovat jako iniciátoři regenerace ve smyslu aktivace pro-myogenních elementů (Merly et al. 1999).

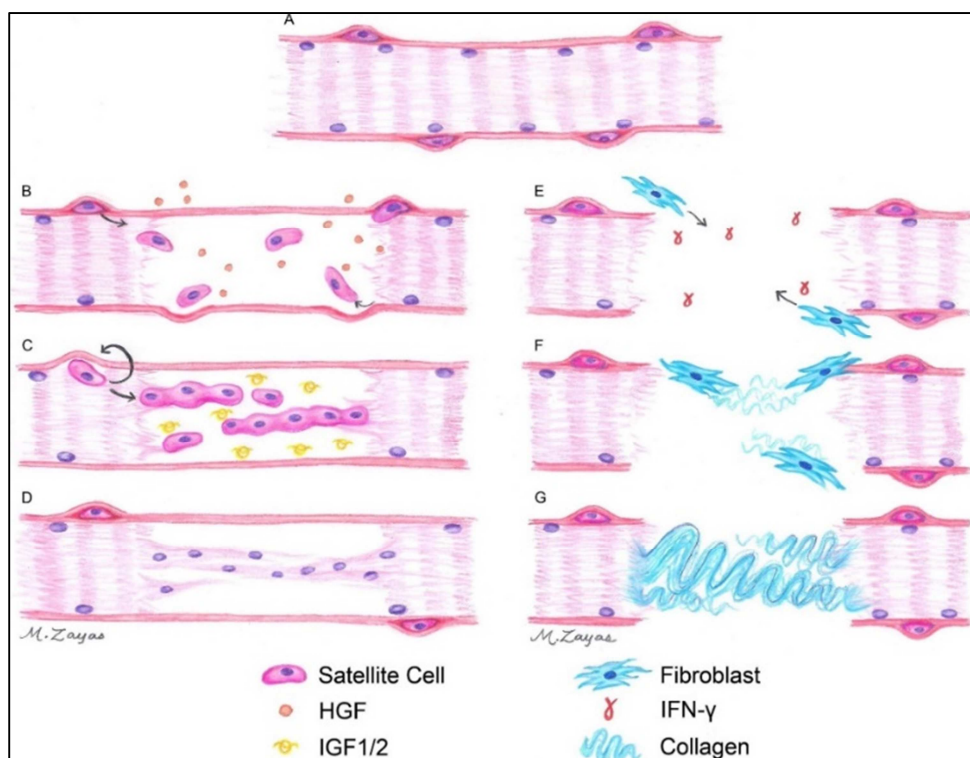
Důsledná znalost anatomické a morfologické charakteristiky kosterní svaloviny napomáhá vytvořit biomateriál s vlastnostmi a strukturou téměř identickými s nativní tkání. Jedním ze způsobů, jak vytvořit takovýto materiál, je decelularizace svalové tkáně.

2.6 Decelularizace kosterní svaloviny

V současné době existují dva možné přístupy vývoje biomateriálů pro regeneraci kosterní svaloviny; je to buď tvorba konstruktů kosterní svaloviny *in vitro*, které podpoří regeneraci svaloviny nebo skafoldů k regeneraci poškozené svaloviny *in vivo*. Skafold napodobuje buněčné uspořádání a stimuluje znovuoobnovení cévní a nervového zásobení, může sloužit jako transportér pro progenitorové buňky, aby došlo k navýšení počtu buněk schopných regenerovat vytvořené poškození tkáně společně s buňkami rezidentními. Ovšem skafold nemusí být osazen jen kmenovými buňkami, ale také může být obohacen o růstové faktory. Velmi důležitým faktorem pro výběr vhodného skafoldu je jeho schopnost postupně degradovat tak, aby byla poškozená tkáň dostatečně stabilní před úplným odbouráním biomateriálu.

Decelularizovaná kosterní svalovina, jakožto biomateriál nahrazující poškozenou nebo chybějící tkáň, je užitečným nástrojem pro regeneraci. Decelularizace tkání je poměrně rozšířenou metodou tkáňového inženýrství a je možné ji aplikovat na téměř jakoukoliv tkáň či orgán. Metody používané pro odstranění buněčných komponent z tkáně nejsou v případě kosterní svaloviny odlišné od popsaných způsobů v kapitole „Decelularizace“; příprava skafoldu nejčastěji zahrnuje působení chemických agens (především SDS a/nebo Tritonu X-100) společně s enzymy (Hurd et al. 2015; Waasenaar et al. 2015; Zhang et al. 2016).

Procesy, které se dějí po implantaci decelularizovaného skafoldu, korespondují s procesy probíhajícími během regenerace svalových poškození malého rozsahu, které je kosterní svalovina schopna opravit bez vnějšího zásahu. Regenerace kosterní svaloviny probíhá ve třech krocích: fáze degenerace, regenerace a následná remodelace (Badylak et al. 2016). Degenerace poškozené kosterní svaloviny zahrnuje porušení kontinuity svalového vlákna a přilehlých stromálních struktur (řídké kolagenní vazivo a ECM) a vcestování prozánětlivých buněk. Jestliže nedojde k porušení laminy externy svalového vlákna, následuje fáze regenerace, při níž jsou aktivovány satelitní buňky. Ty pak migrují k místu poškození, diferencují se v myoblasty a po jejich fúzi vznikají syncytia, svalová vlákna. Vytvoření plnohodnotné kosterní svaloviny se děje v průběhu fáze remodelace, kdy dochází k prostorové organizaci nově vzniklých svalových vláken a k vyvinutí funkčních jednotek, myofilament, umožňujících svalovou kontrakci. V případě, že dojde k poškození či dokonce ztrátě svalové tkáně ve větší míře, tak je původní funkční tkáň nahrazena vazivovou jizvou.



Obr. 1 Schematické znázornění regenerace kosterní svaloviny. A) Satelitní buňky uložené mezi sarkolemou a laminou externou svalového vlákna. B) poranění; satelitní buňky jsou rekrutovány do místa poškození a proliferují. C) Proliferující satelitní buňky splývají a formují tak nevyzrálá svalová vlákna, která fúzí s existujícími, plně diferencovanými vlákny (D). Dochází k novotvorbě myofilament, aby se vytvořila funkční tkáň. V případě poškození svalové tkáně ve větším objemu (E) je narušena souvislost laminy externy a dochází k migraci fibroblastů (F). Fibroblasty začínají produkovat kolagenní vlákna, což vede k formování vazivové jizvy. Převzato z: Grasman J. M. et al. 2015

V okamžiku porušení svalového vlákna dochází k uvolnění cytosolu do extracelulární matrix, což má za následek migraci prozánětlivých buněk do místa poškození. Také se vypouštějí chemotaktické látky jako je bFGF a transferin (Tidball 1995). Na tento podnět reagují neutrofily a makrofágy s fenotypem M1 (prozánětlivé), které parakrinně aktivují klidové satelitní buňky (Tidball et al. 2014). M1 makrofágy se následně transformují do svých antagonistů, M2 makrofágů, které jsou hlavními modulátory fáze remodelace. Extracelulární matrix cíleně ovlivňuje konverzi fenotypu makrofágů (Sicari et al. 2014).

Samotná implantace ECM není jediným přínosem pro poškozenou kosterní svalovinu, ale její následná degradace působí chemotakticky na pro-myogenní buňky (Reing et al. 2009). Studie Gilberta prokázala, že decelularizovaný scaffold se po implantaci rozpadne přibližně za

30 dní, ovšem co se týká skafoldu připraveného z denzní tkáně, například z hustého kolagenního vaziva dermis, doba úplné degradace se prodlužuje až na 12 měsíců (Gilbert et al. 2007).

Po implantaci skafoldu dochází k jeho brzké buněčné infiltraci, přičemž se zde nacházejí i buňky, které ke skafoldu migrují v průběhu jeho degradace. Aby došlo k funkční obnově místa poškození, je zapotřebí mechanického zatížení, které má za efekt postupnou náhradu v podobě kosterní svaloviny. Ovšem nelze očekávat úplné obnovení původního funkčního rozsahu, ale pouze částečnou obnovu (Turner et al. 2010). Mechanické zatížení implantovaného skafoldu navíc přispívá k angiogenezi, fyziologickému uspořádání buněk a k migraci tkáňově specifických kmenových buněk (Ambrosio et al. 2009).

2.7 Recelularizace skafoldu kosterní svaloviny

Velmi slibnou buněčnou populací používanou pro regeneraci kosterní svaloviny jsou satelitní buňky, které jsou navíc přirozenou součástí svalových vláken, kde jsou lokalizovány mezi sarkolemou a laminou externou a setrvávají zde v klidovém stavu. Tyto Pax7⁺ buňky se dají snadno izolovat z jednotlivých svalových vláken a po jejich transplantaci do místa poškození splývají s existujícími vlákny a znovuobnovují svalovou funkci, přičemž jediná satelitní buňka vytvoří až 100 svalových vláken (Juhas and Bursac 2013). Přestože mají satelitní buňky obrovský potenciál, mnoho studií má velmi variabilní výsledky při použití této buněčné linie, a to díky nedokonalé izolaci, kdy výsledná buněčná kultura není homogenní a obsahuje i jiné buňky, čímž se snižuje regenerace. Řešení problému tkví v použití FACS, kdy jsou buňky izolovány na základě exprese Pax7 (Bosnakovski et al. 2008). Transplantace aktivních satelitních buněk se také odrazí na navýšení počtu klidových satelitních buněk, čímž se nepřímo zvyšuje regenerační potenciál kosterní svaloviny (Péault et al. 2007).

Další potenciální buněčnou linií pro regeneraci kosterní svaloviny jsou tzv. kmenové buňky odvozené od kosterní svaloviny, *muscle derived stem cells* (MDS_c), které mají schopnost sebeobnovy, vysoký proliferační potenciál, napomáhají novotvorbě dystrofin⁺ svalových vláken u mdx myší, a také jsou multipotentní (Qu-Petersen et al. 2002). Injekční vpravení těchto buněk do krevního oběhu napomáhá regeneraci svalových vláken, doplnění zásob klidových satelitních buněk a zlepšení pohybové funkce pozorovatelné u psů s Duchennovou svalovou dystrofií (Rouger et al. 2011). Transplantace MDS_c do kosterní

svaloviny má dokonce vyšší regenerační potenciál než transplantace satelitních buněk (Péault et al. 2007).

Léčba svalových dystrofií se částečně uskutečňuje za použití mesangioblastů, realizované pouze na zvířecích modelech, jako jsou psi nebo myši (Sampaolesi et al. 2006; Sampaolesi et al. 2003). Buněčná linie byla poprvé izolována z dorzální aorty myši v embryonálním stádiu a analýza jejich markerů zjistila, že tyto buňky mají schopnost sebeobnovy, mohou se diferencovat do různých typů tkání (kosterní a srdeční svalovina, kost, chrupavka) (Berry 2015; Minasi et al. 2002). Ovšem výskyt mesangioblastů není limitován pouze na embryonální stádium, ale tyto buňky se mohou izolovat i postnatálně. Transplantace se nejčastěji děje intravenózní cestou, přičemž mesangioblasty se předtím *in vitro* vystavují vlivu SDF-1 nebo TNF- α , a tím je usnadněna jejich migrace *in vivo* ke svalu postiženému dystrofií (Galvez et al. 2006). Tyto buňky jsou schopné se diferencovat v myoblasty, které fúzí a vytváří funkční svalová vlákna (Sampaolesi et al. 2006).

Transplantace mezenchymových kmenových (MS) buněk může být také jednou z odpovědí na otázku recelularizace kosterní svaloviny, a to především díky schopnosti sebeobnovy; tyto buňky jsou multipotentní, mohou modifikovat imunitní reakci (Ichim et al. 2010), lze je snadno izolovat z kostní dřeně, případně z tukové tkáně. Přesto nejsou zcela ideálním zdrojem pro regeneraci kosterní svaloviny, což dokázala studie Liu et al. (2007), kdy transplantovali mezenchymální kmenové buňky do nekroticky poškozené svaloviny myši se svalovou dystrofií, přičemž se neprokázalo zlepšení funkce svalu, ale pouze se objevila dystrofin⁺ svalová vlákna. Nejpravděpodobnější příčinou tohoto problému je kontinuální exprese genů mezenchymových buněk po jejich proběhlé transformaci ve svalová vlákna (McCullagh a Perlingeiro 2015). Jejich přínos pro regeneraci kosterní svaloviny ovšem není zanedbatelný vzhledem k parakrinnímu efektu na okolní buňky, čímž se zvyšuje regenerační potenciál (Sassoli et al. 2012).

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSc) jsou dalším možným zdrojem buněk pro recelularizaci skafoldu kosterní svaloviny. iPSc buňky vznikají z plně diferencovaných somatických buněk po působení kombinace transkripčních faktorů. Takto vzniklé buňky lze dále diferencovat *in vitro* za pomoci myogenních regulátorů jako je Pax3 a Pax7 (Darabi et al. 2008) a vznikají tak myogenní elementy vhodné pro transplantaci. Takto připravené buňky po transplantaci výrazně podpořily novotvorbu funkčních svalových vláken a přispěly také k aktivaci satelitních buněk (Darabi et al. 2009). iPSc buňky jsou atraktivní pro tkáňové inženýrství z důvodu generování buněk pacientu vlastních, které se následně použijí

k autologní transplantaci. Konkrétní využití autologních buněk pacienta bylo zaznamenáno například při léčbě makulární degenerace (Kamao et al. 2014). Přesto zatím nebyly publikovány studie, zabývající se regenerací kosterní svaloviny pomocí indukovaných pluripotentních kmenových buněk.

3. CÍLE PRÁCE

Hlavními cíli této disertační práce bylo:

- připravit dostatečně efektivní a zároveň šetrný decelularizační protokol k odstranění buněk z kosterní svaloviny
- histologická a biochemická evaluace připraveného skafoldu kosterní svaloviny
- stanovení kompatibility připraveného skafoldu s různými buněčnými kulturami v experimentech *in vitro*
- stanovení kompatibility připraveného skafoldu *in vivo*

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Pokusná zvířata

Všechny pokusy na laboratorních zvířatech byly prováděny ve viváriu Lékařské fakulty v Hradci Králové. Experimenty *in vitro* a *in vivo* byly schváleny Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty Lékařské fakulty v Hradci Králové dle platného zákona č. § 18 písm. b, h zákona č.246/92 Sb. a zákona 312/2008 Sb. na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů a § 11 vyhlášky č. 39/2009 Sb. o ochraně chovu a využití pokusných zvířat. Pokusy byly provedeny na myších kmenu C57BL/6 stáří 8 – 12 týdnů o průměrné hmotnosti 30 g. Myši jsou chovány za standardních podmínek při konstantní teplotě.

4.2 Buněčné linie

4.2.1 Kultivace C2C12 myoblastů

Pro experiment se použily myší myoblasty buněčné linie C2C12 (ATCC). Kultivační médium pro tyto buňky obsahovalo DMEM médium (Invitrogen), 10% FBS (Invitrogen) a 100 U/ml penicilin/streptomycinu (Invitrogen). Kultivace těchto buněk probíhala v kultivačních lahvích o objemu 75 cm² při 37 °C a 5% CO₂.

4.2.2 Izolace a kultivace kmenových buněk odvozených od kosterní svaloviny (MDSc)

Myši kmene C57BL/6 se usmrtí éterem a následně jim jsou oholeny zadní končetiny. Proveďte se excize kosterní svaloviny (*m. gastrocnemius*, *soleus* nebo *quadriceps femoris*) a svalovina se umístí do centrifugační zkumavky s HBSS puřem (Invitrogen). Další práce s tkání probíhá v laminárním boxu a postupuje se podle protokolu publikovaného Lavananim (Lavanasi et al. 2013).

Kultivační médium pro MDSc obsahuje DMEM (Invitrogen), obohaceném o 4,5 g/L D-glukózy, L-glutamin, 110 mg/L pyruvátu sodného, 10% bovinní sérum, 10% koňské sérum,

0,5% fetální kuřecí extrakt (Invitrogen) a 100 U/ml pencilin/streptomycinu (Invitrogen) a samotná kultivace probíhá při 37°C v inkubátoru s 5% CO₂. Médium se mění každý 2. den a buňky se pasážují při dosažení 70-90% konfluence. Buňky použité k osazení skafoldu byly v 1. pasáži.

4.2.3 Izolace a kultivace myogenních progenitorových buněk

Pro experiment byly použity lidské plicních fibroblasty WI38 (Sigma), které se reprogramovaly dle protokolu CytoTune™ -iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen). Z takto připravených iPS buněk se diferencovaly myogenní progenitorové buňky, a to podle protokolu publikovaném Sheltonem (Shelton et al. 2016). Výsledná buněčná linie obsahuje Pax7+ buňky a myoblasty a je kultivována v E6 médiu (Essential 6 Medium), obohaceném o 5 ng/μl bFGF (Invitrogen). Buňky použité k osazení skafoldu byly ve 2. pasáži.

4.3 Decelularizace kosterní svaloviny

Myš kmene C57BL/6 byla usmrcena roztokem éteru a oholila jsem zadní končetiny zvířete. Z této oblasti jsem provedla excizi *m. tibialis anterior*. Odebraná tkáň byla poté propláchnuta PBS pufrem a následně tkáň prošla decelularizačním protokolem, sestávajícím se z těchto kroků:

1. hypertonický roztok 1M NaCl (inkubační doba 2 hodiny při 4°C)
2. hypotonický roztok 10mM TrisHCl (inkubační doba 22 hodin při 4°C)
3. decelularizační agens 1% SDS (inkubační doba 24 hodin při laboratorní teplotě)
4. 0,1% roztok kyseliny peroctové, pH = 7 (inkubační doba 4 hodiny při 4°C)
5. DNáza (inkubační doba 60 minut při 37°C)
6. PBS pufr (inkubační doba 24 hodin při 4°C)

Takto připravené skafoldy jsem použila pro histologickou či biochemickou analýzu nebo jsem je uskladnila ošetřené proteázovým inhibitorem při -20°C.

4.4 Morfologická analýza decelularizované kosterní svaloviny

4.4.1 Histologické barvicí metody

Všechny skafoldy byly fixovány 10% roztokem formalínu a následně dehydratovány a prosyceny parafínem, do kterého byly vzorky zality a následně nakrájeny na mikrotomu na 5 μ m. Pro první inspekci tkáně se zvolilo standardní barvení pomocí hematoxylin eosinu. Pro další zhodnocení skafoldu a potvrzení přítomnosti základních komponent ECM jsem použila specifické barvicí techniky jako je resorcin-fuchsin, barvení siriovou červení, modrým trichromem, alciánovou modří a Jonesovu impregnací.

4.4.2 Imunohistochemické hodnocení decelularizované kosterní svaloviny

Imunohistochemické metody byly použity pro specifický důkaz zachování kolagenu IV a lamininu. Preparátové řezy jsem odparafinovala a umístila do citrátového pufru (pH = 6) po dobu 15 minut při 95°C pro odhalení epitopů. Endogenní aktivita peroxidázy jsem utlumila inkubací s roztokem 5% peroxidu vodíku (Lachner) po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Nespecifické navázání protilátky bylo eliminováno pomocí neimunního séra (Dako), které se inkubovalo s preparátem po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Preparáty jsem ošetřila primárními protilátkami; anti-kolagen IV (ředění 1:200, Abcam) nebo anti-laminin (1:25, Abcam), jejichž inkubace probíhala přes noc při 4°C. Po oplachu primární protilátky PBS pufrem jsem aplikovala sekundární biotinylovanou protilátku (ředění 1:250, Dako), která se inkubovala po dobu 45 minut při laboratorní teplotě. Po promytí PBS pufrem jsem aplikovala streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou (pro kolagen IV, Dako) nebo streptavidin konjugovaný Cy3 (pro laminin, Dako) po dobu 45 minut při laboratorní teplotě. Po odmytí obou variant streptavidinů PBS pufrem se řezy v případě imunohistochemie dále ošetřily DAB (Sigma) a následně se dobarvovaly hematoxylinem. Řezy určené pro imunofluorescenci jsem po oplachu PBS pufrem dobarvila pomocí DAPI (Sigma). Pro analýzu obou druhů preparátů jsem použila mikroskop BX51 (Canon) vybavený fluorescencí a DP-71 kamerou (Canon).

4.4.3 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Kontrolní fyziologický kosterní sval a decelularizovaný kosterní sval byl zfixován 2% paraformaldehydem (Sigma) s 1% glutaraldehydem (Sigma) ve fosfátovém pufru po dobu 2h při 4 °C. Tento proces je následován několikerým promytím fosfátovým pufrem. Dále je použita post-fixační tekutina, 2% OsO₄ (SPI) ve fosfátovém pufru, do které je vzorek umístěn a za stálého míchání tekutina prostupuje vzorkem po dobu 1 hodiny. Poté je vzorek ponořen do 10% roztoku sacharózy (Sigma) a je takto umístěn přes noc do chladničky. Následující den je vzorek dehydratován pomocí rostoucí alkoholové řady, promýván roztokem propylen oxidu po dobu 30 minut (Sigma) a prosycen pryskyřicemi (Epon-Durcupan), které polymerizují 3 dny při 60 °C. Výsledné bločky jsou nakrájeny na ultramikrotomu na 50-60 nm ultratenké řezy, které následně prochází procesem kontrastování pomocí solí těžkých kovů (uranylacetátu nebo acetátu olova; Sigma). Vzorky byly následně hodnoceny pomocí transmisního elektronového mikroskopu BS500 (Tesla). Snímky byly zachyceny digitálním fotoaparátem Megaview G2 (Olympus) a analyzovány softwarem iTEM (Olympus).

4.5 Biochemické zhodnocení efektivity decelularizace

4.5.1 Western blott

Tkáňové lyzáty byly připraveny následovně: decelularizované skafoldy a kontrolní fyziologická svalovinu jsem nakrájela na malé kousky (cca 1x1 mm) a poté inkubovala s RIPA pufrem (Sigma) společně s proteázovým inhibítorem (Milipore). Tuto směs jsem rozmělnila pomocí homogenizátoru (Ika) a výsledný lyzát inkubovala 30 minut na ledu. Následovala centrifugace při 14 000 rpm (Hermle) po dobu 5 minut při 4 °C. Celkové množství proteinů jsem stanovila pomocí microBCA kitu (Sigma) a analyzovala spektrofotometrem TECAN M200.

Na gel jsem nanasla stejné množství proteinů (30 µg) obou zkoumaných vzorků (decelularizovaného skafoldu a neošetřené kosterní svaloviny), které byly separovány elektroforézou a následně přeneseny na PVDF membránu (GE Healthcare Lifescience). Tuto membránu jsem inkubovala s 5% mlékem (Bio-Rad), které zabrání nespecifickému navázání primární protilátky. Membránu jsem poté inkubovala s primární protilátkou anti-laminin

(1:2000, Abcam) a anti-GAPDH (1:10,000, Sigma), sloužící jako nanášecí kontrola. Obě tyto protilátky jsou inkubovány s membránami přes noc při 4°C. Poté jsem membránu promyla 0,1% TBS-T pufrem a následovala inkubace se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou (1:2000, DAKO). Abych snížila signál pozadí, je membrána podrobena důkladnému promytí pomocí 0,1% TBS-T pufru po dobu 45 minut. Jako chemiluminiscenční substrát jsem použila ECL roztok firmy ThermoScientific. Vyvolání filmu bylo provedeno vyvolávacím automatem (Protect GmbH & Co. KG). Jako kontrolu jsem použila fyziologický sval, který prodělal stejný proces jako decelularizovaný skafold.

4.5.2 Hydroxyprolinová analýza

Čerstvě odebraný sval, sloužící jako kontrola, a čerstvě připravený decelularizovaný sval jsem nakrájela na malé kousky, vážící $40 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$. Tyto vzorky se vysuší při 60°C po dobu 3 hodin, jsou znovu zváženy a posléze hydrolyzovány 6M kyselinou chlorovodíkovou přes noc. Výsledný lyzát jsem zcentrifugovala (Hermle) při 10,000 rpm po dobu 10 minut a využila na hydroxyprolinovou analýzu.

Tyto lyzáty jsou 100x zředěny citrát-acetátovým pufrem a poté inkubovány s roztokem chloraminu-T (Sigma) při laboratorní teplotě po dobu 20 minut. Ke vzorkům jsem poté přidala roztok 3M kyseliny chloristé (Sigma), který se se vzorky inkubuje 5 minut při laboratorní teplotě. Posledním krokem je přidavek detekčního činidla PDAB (Sigma), působícího po dobu 20 minut při 60°C. Podle množství kolagenu v lyzátu dochází k barevné změně, kdy u vzorků s vyšším obsahem kolagenu přechází původní žluté zbarvení do růžové barvy. Tato změna je spektrofotometricky zhodnocena (570 nm, TECAN M200) a srovnána se standardy L-hydroxyprolinu (Sigma). Ze změřené hodnoty hydroxyprolinu se vypočítá konečná hodnota kolagenu ve vzorku.

4.5.3 DNA izolace a kvantifikace

Účinnost eliminace jaderných komponent jsem verifikovala pomocí DNA izolace a kvantifikace. Vzorky fyziologických kontrol a decelularizovaných skafoldů jsem navážila na hmotnost 25 mg ($\pm 1 \text{ mg}$) a chirurgickým skalpelem rozmělnila na malé kousky a inkubovala s proteinázou K a pufrem ATL, vše se řídilo pokyny DNeasy Blood and Tissue Kit firmy

Qiagen. Výslednou izolovanou DNA jsem následně kvantifikovala pomocí kitu Quantifluor dsDNA firmy Promega. Kvantifikace proběhla na fluorescenčním spektrofotometru TECAN M200. Výsledné koncentrace jsem vypočítala z kalibrační křivky standardů.

4.6 Analýza podpory buněčného růstu na decelularizovaném skafoldu

4.6.1 Recelularizace decelularizovaného skafoldu pomocí C2C12 myoblastů

Připravený skafold kosterní svaloviny jsem osadila myoblasty linie C2C12, které jsem kultivovala v DMEM médiu (Invitrogen) s 10% fetálním bovinním sérem (Invitrogen) a 100 U/ml pencilin/streptomycinem (Invitrogen). Použité myoblasty byly v 5. pasáži v počtu přibližně 3×10^5 /ml kultivačního média. Buňky jsem ztrypsinizovala (Invitrogen), zcentrifugovala (centrifuga, Hermle) a jejich suspenze byla injekčně vpravena do nitra skafoldu v počtu cca 50 tisíc buněk na jeden skafold. Takto byly skafoldy kokultivovány s myoblasty po dobu 3, 6, 9, 12 a 14 dní. V těchto časových intervalech jsem skafoldy z Petriho misky odebrala a zfixovala 10% formaldehydem. Poté jsem vzorky zalila parafínem a bločky nakrájela na mikrotomu. Preparáty jsem následně obarvila hematoxylinem eosinem a provedla jsem imunohistochemickou analýzu proliferace buněk (PCNA).

4.6.2 Recelularizace decelularizovaného skafoldu pomocí kmenových buněk odvozených od kosterní svaloviny (MDSc)

Připravený skafold kosterní svaloviny jsem osadila MDSc, konkrétně se jednalo o PP4 pasáž (pre-plate cells 4; směs myoblastů, myotub a fibroblastů) a PP6 pasáž (pre-plate cells 6; především *muscle derived stem cells*), které jsem kultivovala v DMEM médiu (Invitrogen) s 10% fetálním bovinním sérem (Invitrogen) a 100 U/ml pencilin/streptomycinem (Invitrogen). Použité myoblasty byly v 1. pasáži v počtu přibližně $3,7 \times 10^5$ /ml kultivačního média. Buňky jsem ztrypsinizovala (Invitrogen), zcentrifugovala (centrifuga, Hermle) a jejich suspenzi injekčně vpravila do nitra skafoldu v počtu cca 50 tisíc buněk na jeden skafold. Takto byly buňky a skafoldy kokultivovány po dobu 7 a 14 dní. V těchto časových intervalech jsem skafoldy z Petriho misky odebrala a zfixovala 10% formaldehydem. Poté jsem vzorky zalila parafínem a bločky nakrájela na mikrotomu. Preparáty jsem následně obarvila hematoxylinem eosinem.

4.6.3 Recelularizace decelularizovaného skafoldu pomocí myogenních progenitorových buněk

Připravený skafold kosterní svaloviny jsem osadila myogenními progenitorovými buňkami, které byly kultivovány v E6 médiu (Invitrogen) s 10% fetálním bovinním sérem (Invitrogen) a 100 U/ml pencilin/streptomycinem (Invitrogen). Použitá buněčná linie byla v 2. pasáži v počtu přibližně 3×10^5 /ml kultivačního média. Buňky jsem ztrypsinizovala (Invitrogen), zcentrifugovala (centrifuga, Hermle) a jejich suspenzi injekčně vpravila do nitra skafoldu v počtu cca 50 tisíc buněk na jeden skafold. Takto byly skafoldy kokultivovány s myogenními progenitorovými buňkami po dobu 7 a 14 dní. V těchto časových intervalech jsem skafoldy z Petriho misky odebrala a zfixovala 10% formaldehydem. Poté jsem vzorky zalila parafínem a bločky nakrájela na mikrotomu. Preparáty jsem následně obarvila hematoxylinem eosinem a provedla jsem imunofluorescenční analýzu na přítomnost myogeninu a Pax3.

4.7 Implantace decelularizovaných skafoldů do C57Bl/6 myši

Charakteristika remodelace skafoldů *in vivo* byla provedena na modelu svalového poškození svalu *m. tibialis anterior*, který jsem chirurgicky odstranila myši kmene C57Bl/6 uvedené do anestezie pomocí ketamin-xylozinu. Na místo poškození jsem vpravila decelularizovaný skafold o velikosti cca 1 x 1 mm a defekt zašila pomocí šicího materiálu Vicril. Myši jsem poté usmrtila v intervalu 1, 2, 3 a 4. týdnů po operaci a *m. tibialis anterior* jsem společně s implantovanými skafoldy odebrala a zfixovala 10% formalínem. Tyto vzorky jsem standardně histologicky zpracovala. Parafínové řezy jsem následně obarvila hematoxylinem eosinem a Massonovým trichromem.

4.8 Statistická analýza

Všechna data se analyzovala prostřednictvím MS Excel 2007 a softwarem NCS 2007. Pro zjištění normálního rozložení dat byl použit test D'Agostino Omnibus. Výsledné koncentrace u kvantifikace DNA a kolagenu byly porovnávány v t testu a Levenův test byl použit k ověření homogenního rozptylu dat v grafu (homoskedasticita). Hodnota $p < 0,05$ je považována za statisticky signifikantní. Všechny výsledky byly prezentovány se standardní odchylkou.

5. VÝSLEDKY

5.1 Morfologické zhodnocení decelularizovaného svalu

5.1.1 Histologie

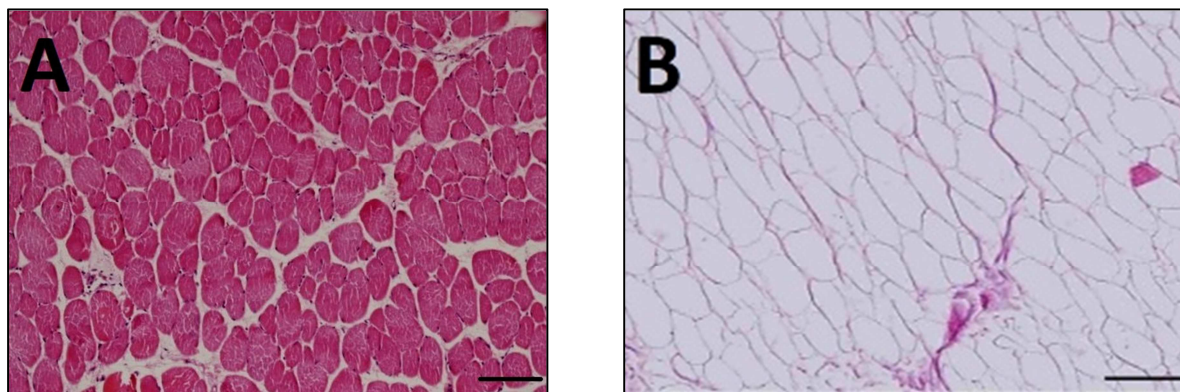
Decelularizační protokol zahrnuje působení hypotonických a hypertonických roztoků, působících sraštění sarkolemy, jejíž rozpad se završí působením hlavního decelularizačního agens, sodium dodecyl sulfátu. Další kroky decelularizace slouží k vyplavení komponent sarkoplazmy a k redukci DNA. Výsledná extracelulární matrix kosterní svaloviny, je průsvitná a zachovává si původní tvar a strukturu. Přesto dochází ke změně velikosti v porovnání s neošetřenou svalovinou, a to především díky eliminaci svalových vláken, tvořících majoritní část kosterní svaloviny (obr. 2).



Obr. 2: Porovnání velikosti a tvaru neošetřené kosterní svaloviny (vlevo) a decelularizované kosterní svaloviny (vpravo).

Histologická analýza parafrínových řezů skafoldu je prvním krokem pro inspekci, protože umožní nejrychlejší zhodnocení efektivity decelularizačního procesu. Standardní barvení hematoxylin eosinem (obr. 3) odhalilo odstranění buněčných komponent z tkáně, přestože nedošlo k porušení základního architektonického principu kosterní svaloviny, která si zachovala strukturu typickou pro tuto tkáň. Absence jader je potvrzena především díky hematoxylinu, který se váže na jaderný chromatin, ovšem v případě skafoldu nebyly tyto komponenty přítomny. Pro druhotné potvrzení mojí domněnky bylo dále použito fluorescenční barvení DAPI, které se typicky váže na DNA, konkrétně do míst bohatých na adenosin-thyminové vazby. Nulový signál při analýze parafrínových řezů prokázal eliminaci

jader ze skafoldu. Barvení eosinem dokumentovalo odstranění příčně pruhovaných svalových vláken při zachování stromálních komponent ECM, které obklopují prázdná místa polygonálního tvaru po svalových vláknech. Toto barvení shrnuje základní data o úspěšnosti decelularizace, a to především odstranění buněk a jejich případných zbytků z tkáně, dále také zachování stavebního principu tkáně a jejího cévního a nervového zásobení.

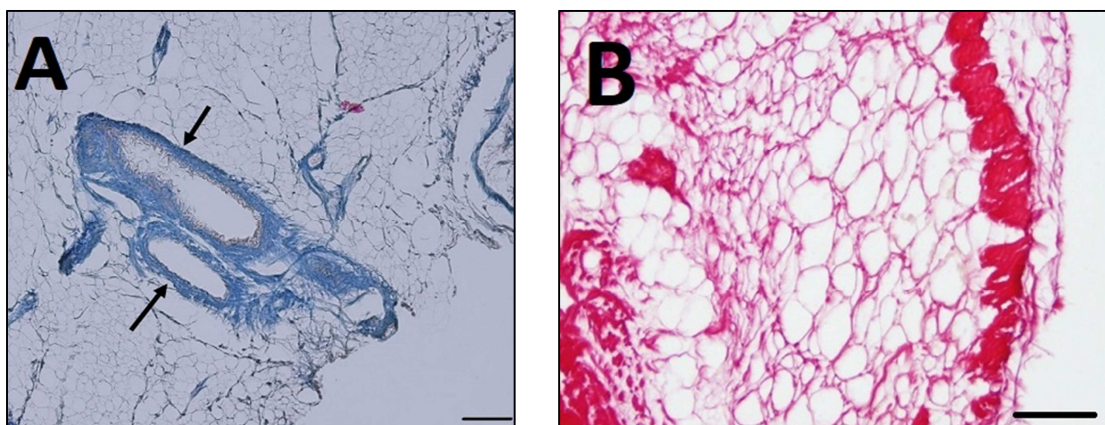


Obr. 3: Parafínové řezy neošetřené kosterní svaloviny (A) a skafoldu kosterní svaloviny (B). Barvení hematoxylin eosinem; měřítko 100 μm .

Nejvíce zastoupenou bílkovinou extracelulární matrix je kolagen, který plní rozličné funkce, ovšem nejrozšířenějším typem je kolagen I, který má strukturální a podpůrnou funkci. Zachování kolagenu je tedy nezbytností, aby nedocházelo k narušení integrity skafoldu. Přítomnost kolagenu v tkáni se dá prokázat barvením siriovou červení nebo Massonovými trichromy, přičemž jsem použila obě metody. Barvení modrým trichromem znázorní kolagenní vlákna modře, jádra modře až hnědočerně a svalstvo červeně. V případě skafoldu došlo k obarvení pouze stromálních struktur, obalujících jednotlivá svalová vlákna. Na tomto řezu (obr. 4A) je možné pozorovat zachované cévní zásobení, respektive jeho decelularizovanou variantu (označeno šipkou).

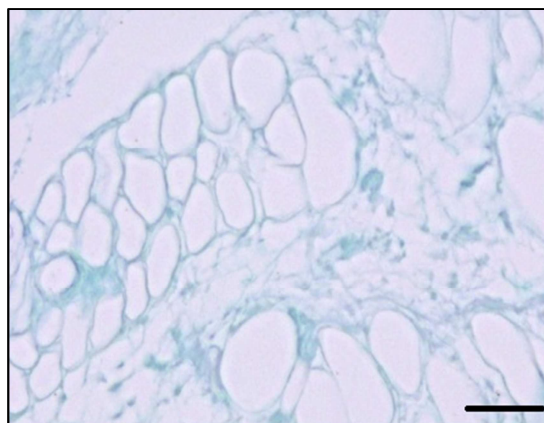
Siriová červeň (Picrosirius Red) je podobně jako Massonovy trichromy speciálním barvením pro kolagenní vlákna, ovšem tato metoda je ještě více specifická. Analýzou řezů obarvených siriovou červení v polarizační mikroskopii je možné rozeznat některé druhy kolagenu, a to díky jejich odlišnému indexu lomu světla. Žlutočerveně se barvící vlákna se skládají z kolagenu typu I, zeleně zbarvená vlákna patří kolagenu typu III. Barvení siriovou červení se využívá pro kvantitativní zastoupení kolagenu ve studované tkáni (Lattouf et al. 2014). Výsledek barvení ve světelné mikroskopii jsou červeně zbarvená kolagenní vlákna a žlutě zbarvená svalovina. Na obr. 4B lze pozorovat barvení siriovou červení na skafoldu, přičemž opět není možné pozorovat přítomnost svalových vláken či jejich jader. Kolagenní

vlákna nevykazují známky poškození, jejich zbarvení je syté, což může poukazovat na dostatečné zachování kolagenu v tkáni.



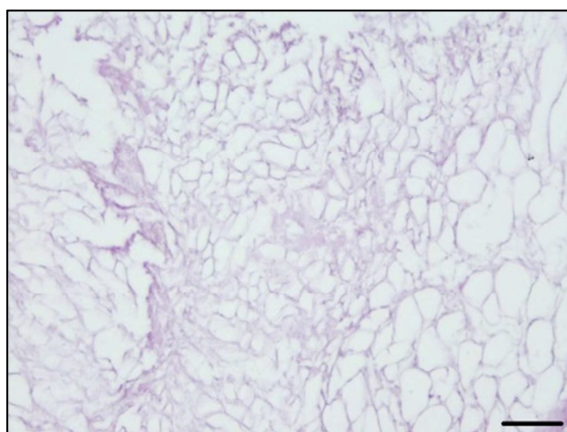
Obr. 4: Porovnání dvou specifických metod pro znázornění kolagenu. Parafrínový řez obarvený Massonovými trichromy (A) a siriovou červení (B). Šipky znázorňují zachování cévního zásobení ve skafoldu; měřítko 100 μm .

Barvením pomocí alciánové modři bylo specificky prokázáno zachování kyselých glykosaminoglykanů (GAG), které jsou podstatné nejen pro vazbu vody, ale i pro případné růstové faktory, jejichž přítomnost je žádoucí zejména pro následnou recelularizaci skafoldu. Výsledkem barvení je modrou barvou znázorněna část ECM, sulfatované glykosaminoglykany a světle růžová svalovina. Řezy se skafoldy vykazovaly po barvení alciánovou modří přítomnost světle modře zbarvených glykosaminoglykanů distribuovaných v ECM (obr. 5). Ovšem vzhledem k velmi světlému zbarvení nejspíše došlo k pouze částečnému zachování GAG, které jsou často působením detergentu degradovány. I toto barvení ilustruje úspěšnou eliminaci svalových vláken společně s jádry a zachování ultrastruktury kosterní svaloviny.



Obr. 5: Barvení skafoldu alciánovou modří; měřítko 50 μm .

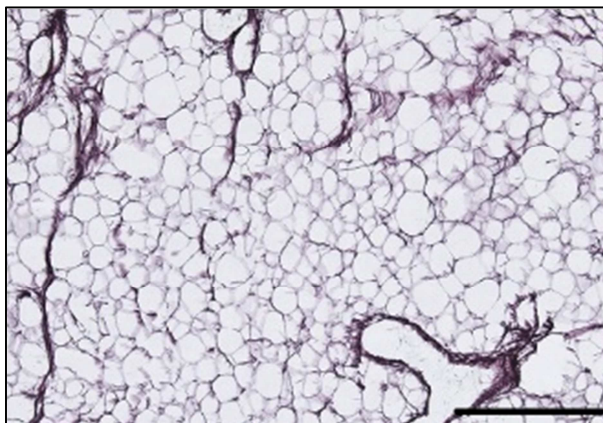
Elastická vlákna jsou další komponentou obsaženou v ECM kosterní svaloviny a nacházejí se často v blízkosti kolagenních vláken, aby pomohla zvýšit jejich míru pružnosti, čímž se zlepší roztažitelnost tkáně a sníží se riziko roztržení tkáně při zvýšeném tahu. Elastická vlákna se specificky barví několika metodami: resorcin-fuchsinem, orceinem nebo aldehydovým fuchsinem. Obr. 6 zobrazuje výsledek barvení resorcin fuchsinem, přičemž elastická vlákna jsou modročerná. Přítomná elastická vlákna nevykazují známky poškození, ani jejich distribuce není pozměněná a lze tak soudit na jejich úspěšné zachování ve skafoldu. Dále se potvrdilo odstranění jaderného materiálu a svalových vláken.



Obr. 6: Skafold obarvený resorcin-fuchsinem pro specifické zvýraznění elastických vláken přítomných především v zachovalém endomyziu; měřítko 50 μm .

Bazální lamina je velmi důležitou strukturou pro ukotvení buněk, jejich adhezi a částečně se podílí i na tkáňové regeneraci. Její zachování je tedy žádoucí vzhledem k výše uvedeným vlastnostem. Bazální lamina svalového vlákna se označuje jako lamina externa

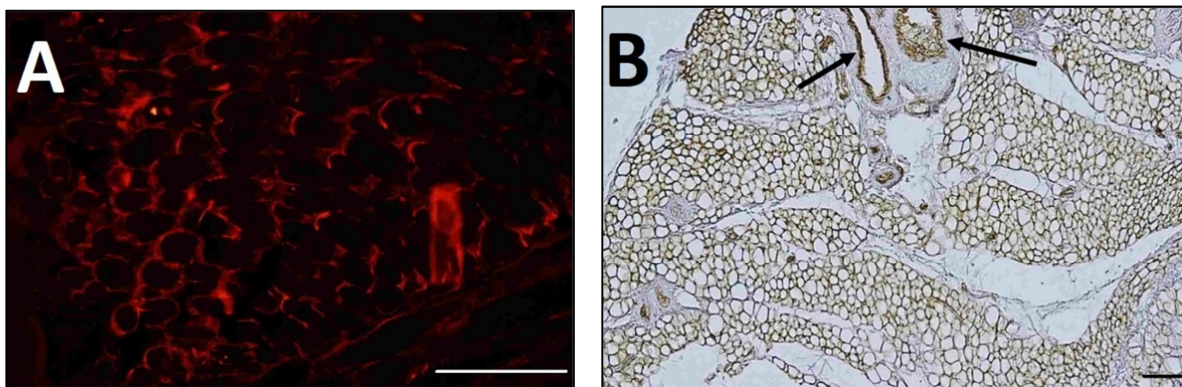
a obklopuje adipocyty či nervová vlákna. Lamina externa se znázorňuje pomocí impregnačních technik, přičemž jedna z nich, Jonesova impregnace, vychází z Gömöriho impregnační techniky. Lamina externa je zvýrazněna vrstvičkou navázaného stříbra, což je pozorovatelné na obrázku 7. Tato struktura nevykazuje poškození, které by mohlo vzniknout během decelularizačního procesu.



Obr. 7: Znázornění laminy externy po odstraněných svalových vláken. Také lze pozorovat i zachovalé bazální membrány cévního zásobení skafoldu. Barveno pomocí Jonesovy impregnace; měřítko 50 μm .

5.1.2 Imunohistochemie

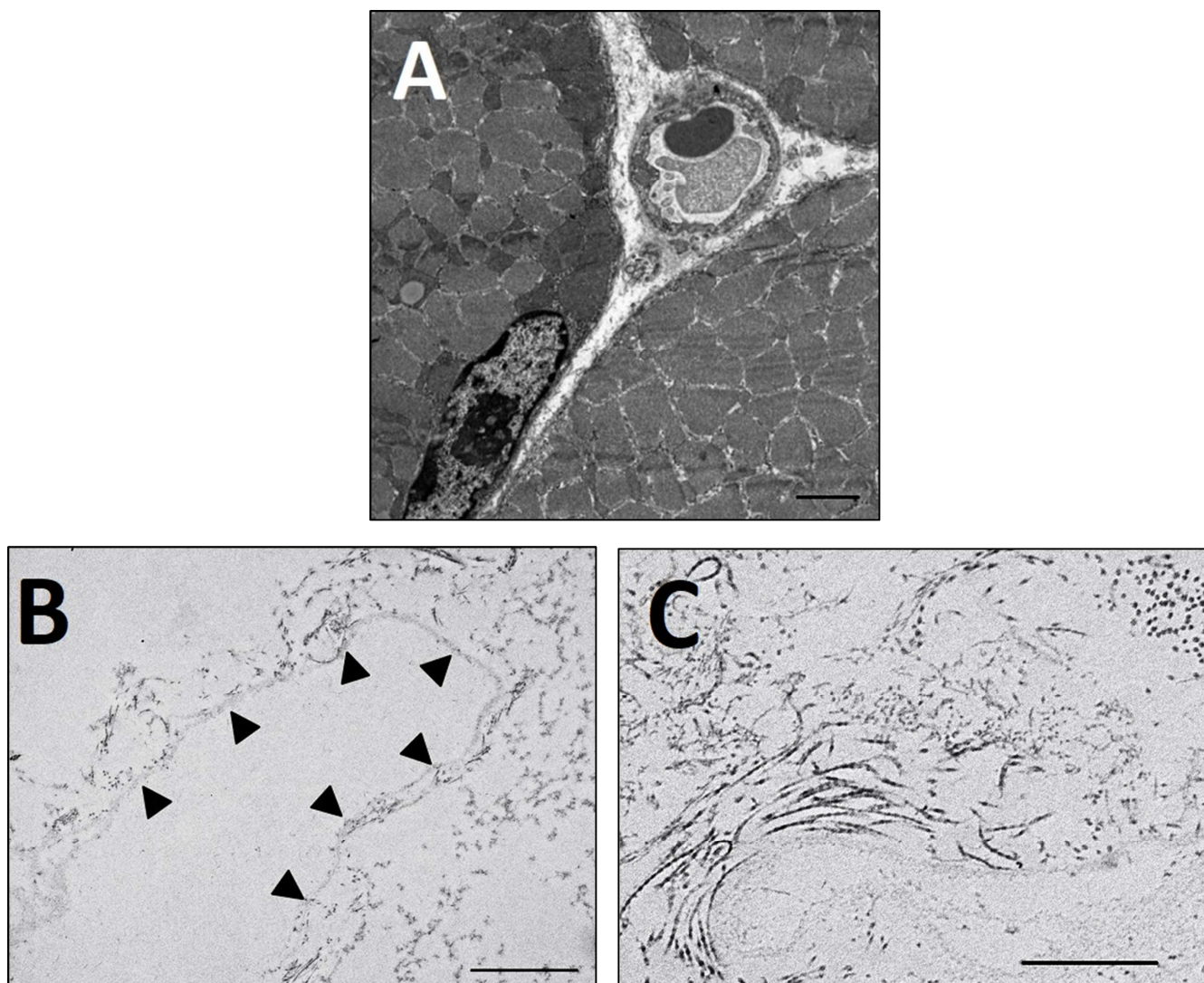
Potvrzení zachování stavebních komponent extracelulární matrix bylo provedeno pomocí imunohistochemické analýzy skafoldu se zaměřením na laminu externu. Tato struktura je nedílnou součástí svalových vláken, která odděluje od stromálních struktur. Nejpodstatnější součástí je laminin, kolagen typu IV, také glykoproteiny (fibronectin, entaktin) a proteoglykany (perlekan). Všechny tyto komponenty se svými vlastnostmi podílejí na celkové funkci laminy externy, jako je ukotvení buněk, filtrace nebo podíl na tkáňové regeneraci. Imunohistochemická analýza skafoldu se zabývala dvěma proteiny přítomnými v lamině externě: lamininem a kolagenem typu IV. Oba tyto proteiny jsou přítomny i po decelularizačním procesu, což potvrzuje efektivitu protokolu. Lamina externa nevykazuje známky poškození a je zachována její celistvost. Na obrázku 8B je v případě řezu ošetřeného protilátkou proti kolagenu IV přítomno i cévní zásobení (označeno šipkami), které má taktéž zachovanou bazální membránu. Na obou řezech je také pozorovatelné charakteristické uspořádání prázdných prostor po odstraněných svalových vláknech.



Obr. 8: Průkaz přítomnosti lamininu (8A, značeno Cy3) a kolagenu typu IV (8B, dobarveno hematoxylinem); měřítko 100 μm .

5.1.3 Elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie odhalila detailní ultrastrukturu skafoldu, kterou jsem porovnála s architektonikou neošetřené kosterní svaloviny (obr. 9A). Intaktní vzorek kosterní svaloviny má charakteristické uspořádání svalových vláken s obsaženými myofilamenty, vykazujících příčné žíhání. Mimo myofilamenta je možné pozorovat i jádra utlačená pod sarkolemou. Tyto struktury již nejsou součástí skafoldu, který je prost cytoplazmatických i jaderných komponent; architektonika skafoldu se shoduje s extracelulární matrix neošetřené svaloviny. Přesto se ve skafoldu nacházejí okrsky, kde se projeví účinky působení osmotického šoku v podobě intersticiálního otoku nebo submikroskopického poškození malého rozsahu. Detailní zvětšení pozorovaného skafoldu odhalilo přítomnost kolagenních vláken, vykazujících žíhání, které je typické pro intaktní kolagenní vlákna (obr. 9C). Dalším ukazatelem efektivního protokolu je pohled na laminu externu, nacházející se v místě původního výskytu svalového vlákna. Lamina externa pozbývá poškození nebo přerušení, tudíž decelularizace se neprojevila na její morfologii (obr. 9B).



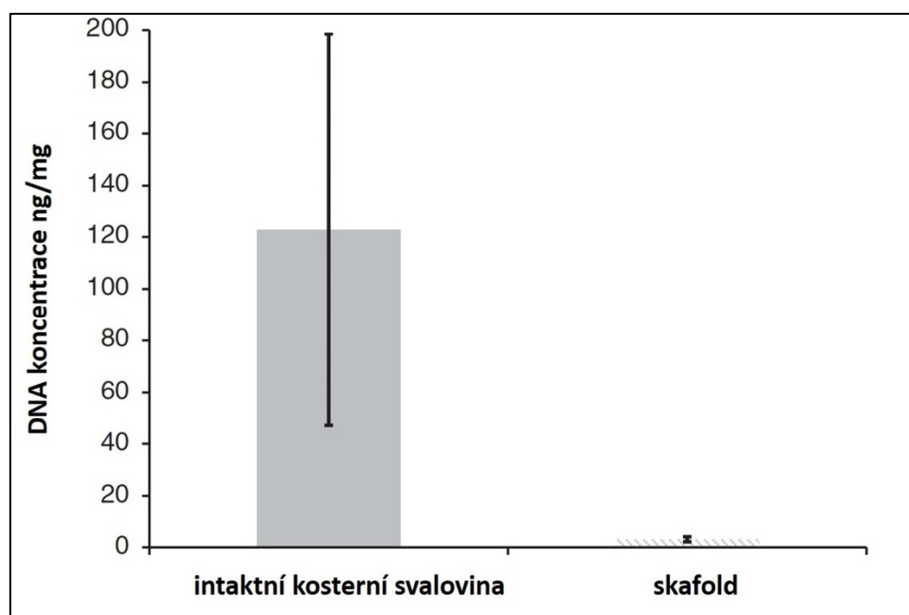
Obr. 9: Elektronogram TEM srovnávající neošetřenou kosterní svalovinu (A) se skafoldem kosterní svaloviny (B, C). Obrázky skafoldu ilustrují zachování laminy externy označené šipkami (B) a kolageních fibril se zachovaným žíháním (C); měřítko je 1 μm .

5.2 Biochemická analýza decelularizovaného skafoldu

5.2.1 DNA kvantifikace

Efektivita decelularizačního protokolu se hodnotí ve dvou kritériích: odstranění cytoplazmy společně s jádry a zachování extracelulární matrix, a to jak z hlediska morfologie, tak funkce. Redukce jaderného materiálu souvisí s následnou implantací skafoldu do zvířete, přičemž perzistence DNA se podílí odvržení implantátu. Kvantifikace DNA je tedy esenciální

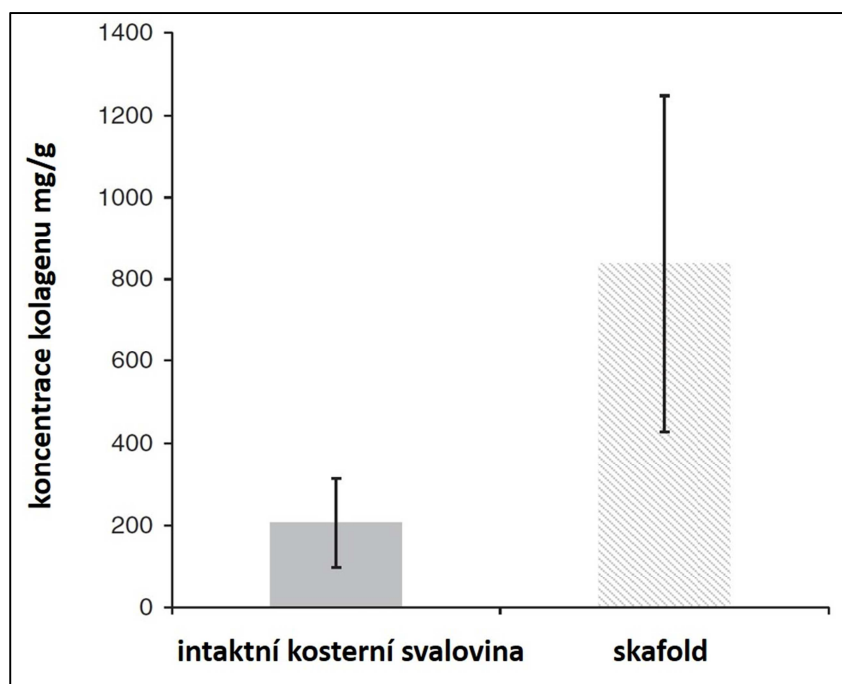
metodou pro stanovení dostatečné redukce množství DNA v tkáni. V případě testovaného skafoldu byla hodnota DNA signifikantně snížena a výsledné množství bylo 3,126 ng DNA na mg tkáně. Intaktní kosterní svalovina, sloužící jako kontrolní vzorek, obsahovala 122 ng DNA na mg tkáně. Oba vzorky jsem kontrolně podrobila separaci pomocí 1% agarózového gelu, který prokázal absenci bandů v případě skafoldu a naopak viditelné DNA fragmenty u intaktní kosterní svaloviny.



Obr. 10: DNA kvantifikace zobrazující hodnoty DNA v neošetřené kosterní svalovině (levý sloupec) a ve skafoldu (pravý sloupec).

5.2.2 Hydroxyprolinová analýza

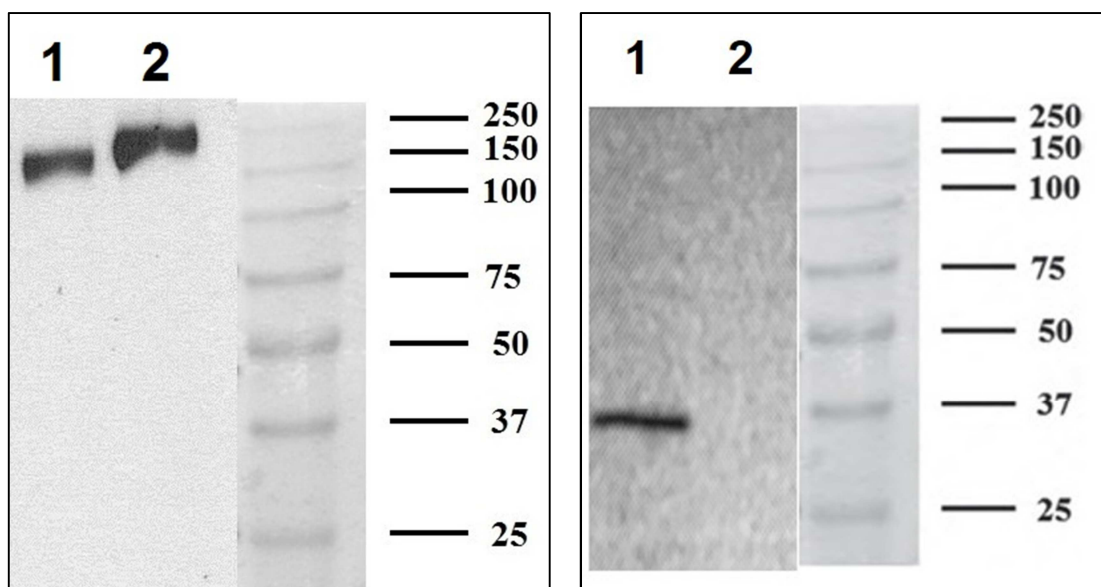
Jak již bylo zmíněno výše, kolagen je nejvíce zastoupenou bílkovinou extracelulární matrix. Jeho přítomnost ve skafoldu jsem potvrdila histologickými technikami, ovšem kvantifikace proběhla pomocí hydroxyprolinové analýzy. Z připravených lyzátů jsem na podkladě výsledků spektrofotometrické analýzy zjistila, že množství kolagenu ve skafoldu bylo 838 mg kolagenu na 1 g tkáně a 206,1 mg kolagenu na 1 g neošetřené svalové tkáně. Zvýšené množství kolagenu ve skafoldu oproti fyziologickému vzorku kosterní svaloviny reflektuje eliminaci cytoplazmatických proteinů, jejichž absenci jsem potvrdila předchozími metodami.



Obr. 11: Koncentrace kolagenu v neošetřené svalové tkáni (levý sloupec) a ve skafoldu (pravý sloupec).

5.2.3 Western blot

Stejně jako imunohistochemie, tak i specifitější Western blot potvrdil zachování lamininu ve skafoldu. Molekulární hmotnost lamininu je 250 kDa a na výsledném filmu je možné pozorovat bandy, jak ze vzorku neošetřené kosterní svaloviny (obr. 12_1), tak i skafoldu (obr. 12_2). Jako nanášecí kontrola jsem použila GAPDH, které mělo pozitivní signál pouze v případě neošetřené svaloviny. Důvod absence tohoto markeru je podmíněn jeho lokalizací; tento protein se nachází v cytosolu buňky, tudíž není možné, aby byl přítomen v decelularizované tkáni vzhledem k eliminaci buněčného materiálu. Jeho absence je nepřímým potvrzením úspěšnosti buněčné eliminace.

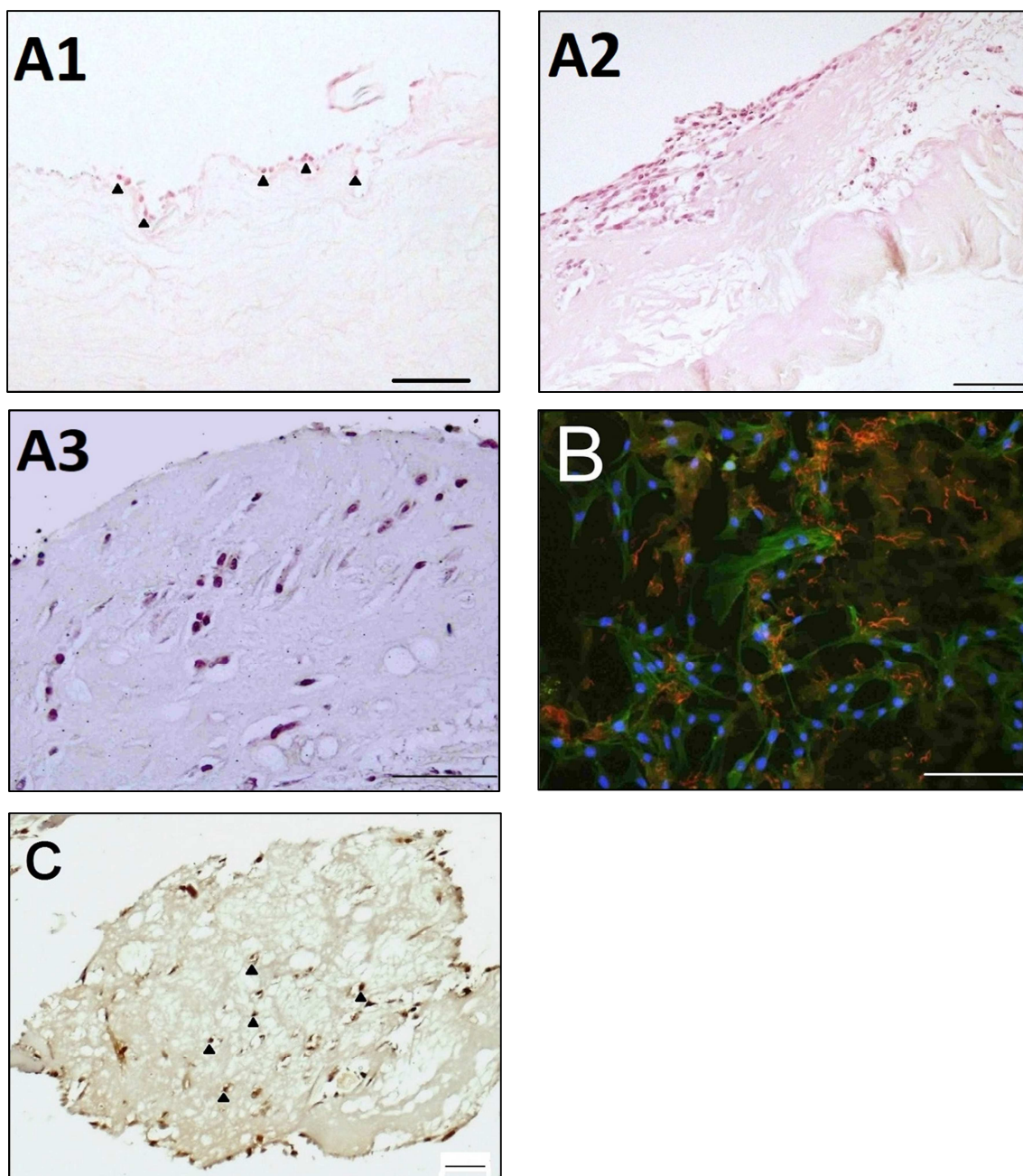


Obr. 12: Zobrazení Western blotu; číslo 1 označuje jamku s neošetřeným kontrolním vzorkem kosterní svaloviny; číslo 2 označuje jamku se skafoldem. Levý WB je výsledkem průkazu zachování lamininu; pravý WB prokazuje přítomnost GAPDH pouze v neošetřené kosterní svalovině.

5.3 Podpora buněčného růstu na decelularizovaném skafoldu

5.3.1 Cytokompatibilita skafoldu s C2C12 myoblasty

Adheze a buněčná proliferace myoblastů linie C2C12 byla pozorována po dobu 14 dní a měla prokázat případnou cytokompatibilitu decelularizovaného skafoldu. Myoblasty během prvního týdne adherovaly na periferii skafoldu, kterou pokryly v nestejných vrstvách od jedné až po tři řady buněk. Během 9. – 12. dne kokultivace se skafoldem docházelo k migraci myoblastů do nitra skafoldu. Rozmístění myoblastů ve skafoldu je řízeno jak myoblasty, tak nepřímo skafoldem, protože buňky osidlují místa s nižší denzitou kolagenních vláken. Myoblasty si zachovaly proliferační potenciál, který jsem prokázala pomocí imunohistochemické detekce PCNA. Přesto nedocházelo k další diferenciaci myoblastů v myotuby, protože jsem neupravila složení kultivačního média. Přítomné myoblasty si zachovaly typickou morfologii s centrálně uloženým jádrem s cytoplazmou bohatou na aktinová filamenta, což jsem prokázala histochemicky pomocí značeného faloidinu. Buňky nevykazovaly polyploidii, známky degradace nebo jiné abnormality.



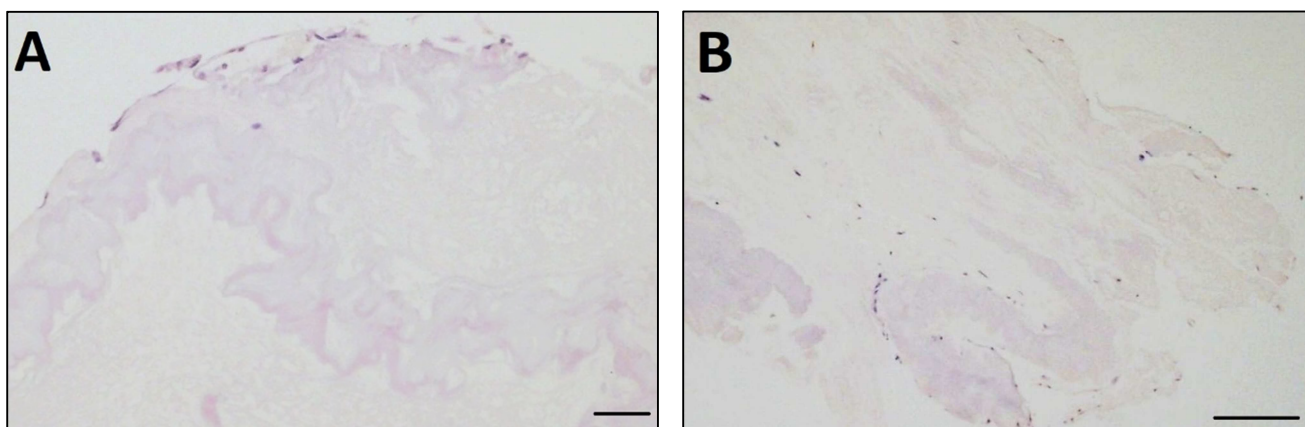
Obr. 13: Parafínové řezy recelularizovaných scaffoldů znázorňují různými metodami analýzu cytokompatibilit. Obrázky 13A barvené hematoxylin eosinem zobrazují časový průběh osidlování scaffoldu. brázek A1 zobrazuje periferně rozmístěné myoblasty 6. den po kultivaci se scaffoldem. Postupně dochází k migraci myoblastů do scaffoldu viditelné na obrázku A2, zachycující 9. den kultivace scaffoldu s buňkami. Dva týdny (A3) po kokultivaci myoblasty osadily částečně jak periferii, tak i nitro scaffoldu. Morfologii myoblastů (B) ve scaffoldu jsme analyzovali pomocí fluorescence, kdy jsme prokázali přítomnost aktinových filament pomocí faloidinu (značený zeleným FITC; B); jejich jádra byla zvýrazněna modře (DAPI); scaffold jsme obarvili přirozeně fluoreskujícím eosinem (oranžová). Zachování

proliferační aktivity jsme demonstrovali pozitivním výsledkem imunohistochemie na PCNA (C), přičemž šipky označují jádra myoblastů; dobarveno hematoxylinem; měřítko 100 μm .

5.3.2 Cytokompatibilita skafoldu s kmenovými buňkami odvozenými od kosterní svaloviny (MDSc)

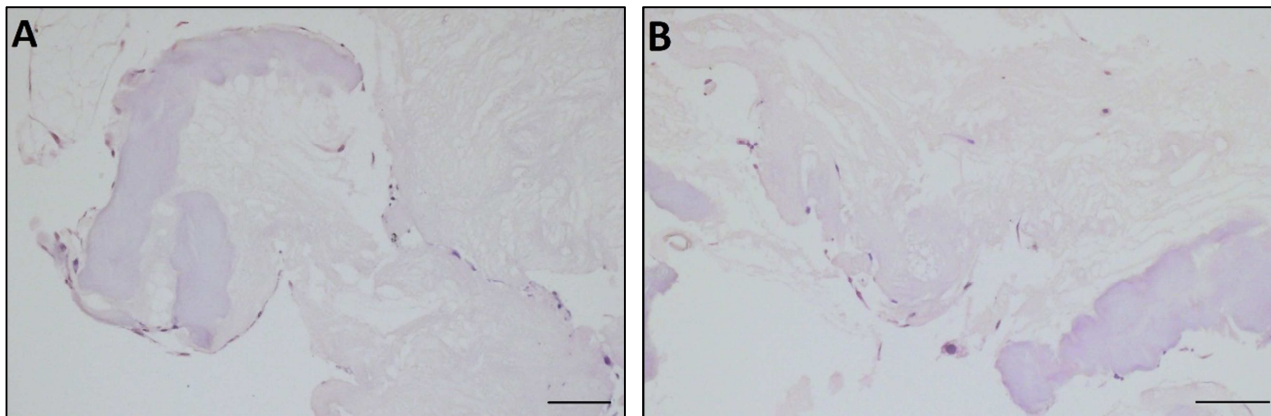
Pro osazení skafoldu se použily pasáže PP4 (směs myoblastů, myotub a fibroblastů) a PP6 (MDSc), které byly společně se skafoldy kokultivovány po dobu 14 dní, kdy polovinu skafoldů jsem odebrala již po 7 dnech.

Skafoldy osazené buňkami pasáže PP4 po 7 dnech od recelularizace (obr. 14A) obsahovaly adherované buňky na periferii, a to v jedné nesouvislé vrstvě. Po 14 dnech od osazení (obr. 14B) se některé buňky objevily v nitru skafoldu, ovšem adherovaných buněk bylo velmi malé množství, které lze vysvětlit nedostatečným množstvím injikovaných buněk. Kultivační médium nebylo nijak modifikováno, a také nebyla pozorována změna v diferenciaci buněk.



Obr. 14: Recelularizované skafoldy 7. den (A) a 14. den (B) po kultivaci s buňkami PP4 pasáže. Barvení hematoxylin eosinem; měřítko 100 μm .

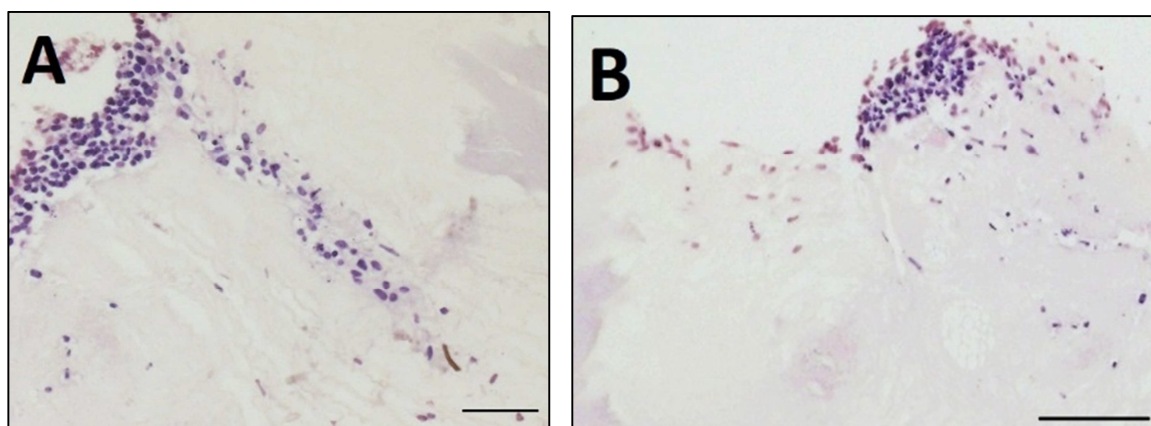
Skafoldy s buňkami pasáže PP6 po sedmi dnech (obr. 15A) od nasazení měly na periferii přítomné buňky, a to v jedné vrstvě. Množství adherovaných buněk je srovnatelné s předchozími výsledky. Po 14 dnech od recelularizace (obr. 15B) začaly buňky migrovat z povrchu i dovnitř skafoldu, ovšem opět nebyla pozorovatelná změna v jejich morfologii a nedocházelo k další diferenciaci buněk. Celkové množství buněk, které adherovaly či penetrovaly do skafoldu, nebylo velké, což má nejspíš stejné vysvětlení jako u předchozí pasáže PP4.



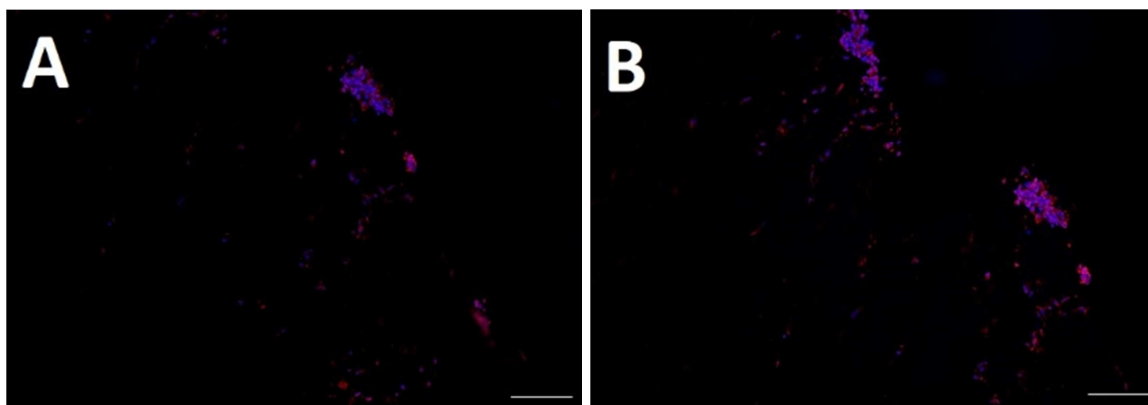
Obr. 15: Recelularizované skafoldy 7. den (A) a 14. den (B) po kultivaci s buňkami PP6 pasáže. Barvení hematoxylin eosinem; měřítko 100 μm .

5.3.3 Cytokompatibilita skafoldu s myogenními progenitorovými buňkami

Buněčná linie, která byla použita pro osazení skafoldu, obsahovala myogenní progenitorové buňky. Buňky byly se skafoldem kultivovány 7 a 14 dní. Skafoldy po sedmi dnech od recelularizace (obr. 16A) vykazovaly bohatou buněčnou adhezi, a to v několika vrstvách buněk. Navíc došlo k migraci buněk do nitra skafoldu. Po 14 dnech od osazení skafoldu (obr. 16B) byly buňky přítomny v nitru skafoldu a zůstaly adherované i na povrchu skafoldu, ovšem nebyla pozorována další diferenciací buněk. Přesto bylo možné pozorovat myogenin⁺ a Pax3⁺ buňky po imunofluorescenční analýze takto recelularizovaného skafoldu (obr. 17).



Obr. 16: Recelularizované skafoldy 7. den (A) a 14. den (B) po kultivaci s myogenním progenitorovými buňkami. Barvení hematoxylin eosinem; měřítko 100 μm .

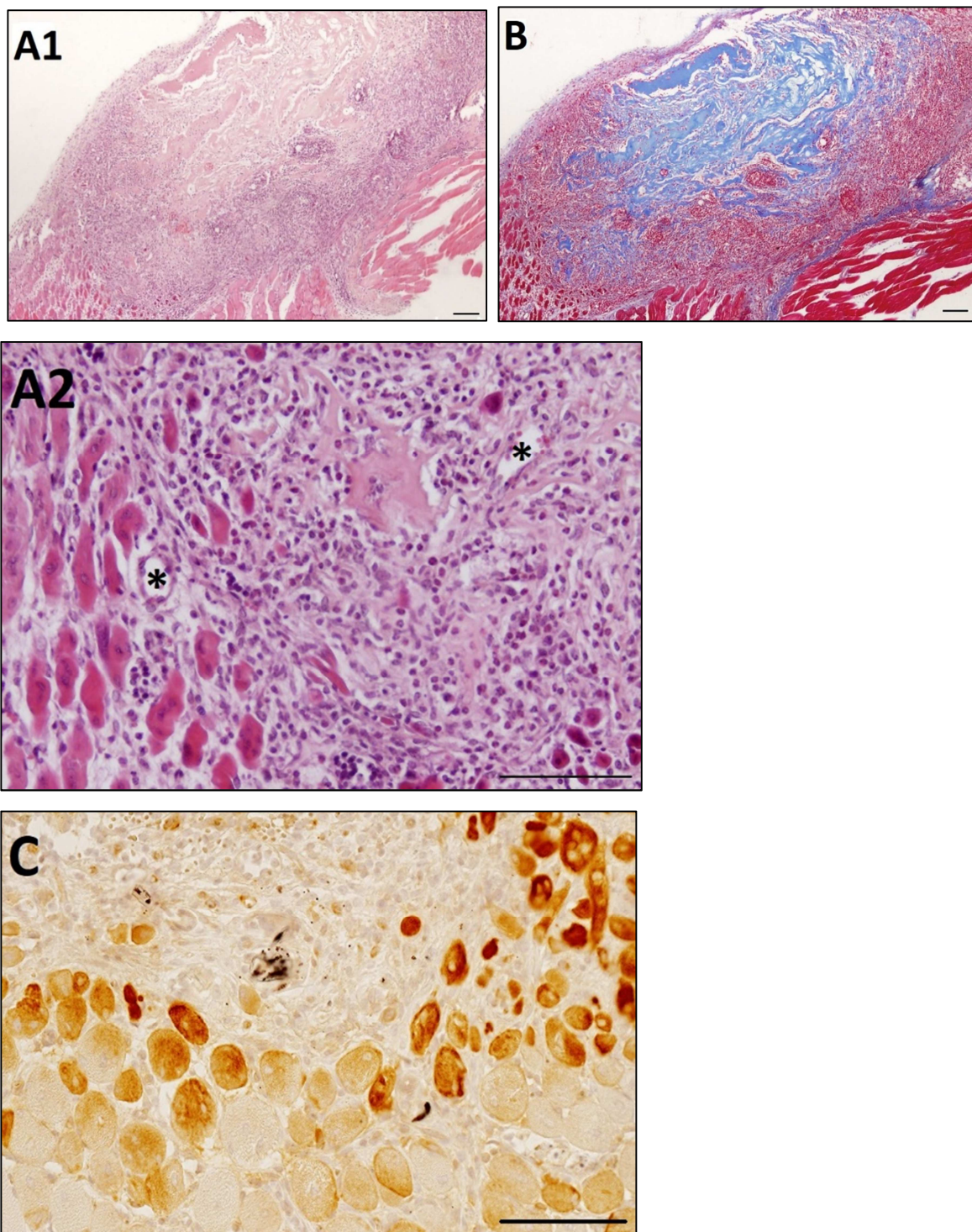


Obr. 17: Imunofluorescenční analýza přítomnosti myogeninu značeného Cy3 (A) a Pax3 značeného Cy3 (B) v myogenních progenitorových buňkách v recelularizovaných skafoldech 14 dní po kultivaci. Jádra dobarvena DAPI; měřítko 200 μm .

5.4 *In vivo* implantace skafoldu do vytvořeného defektu na dolní končetině zvířete

Skafoldy jsem po průkazu cytokompatibility implantovala do myší po vytvoření svalového defektu v místě *m. tibialis anterior*. Skafoldy se ponechaly ve zvířeti po dobu čtyřech týdnů, přičemž každý týden jsem odebrala jedné ze čtyř myší sval s implantovaným skafoldem, a také kontrolní sval z druhé končetiny. Na obou vzorcích jsem provedla histologickou analýzu. Decelularizované skafoldy se úspěšně integrovaly do okolní svalové tkáně a barvení hematoxylin eosinem prokázalo bohatou recelularizaci autologními buňkami hostitele. Všechny skafoldy dokázaly přemostit vytvořený defekt a žádný z implantátů nevyvolal tak rozsáhlou imunitní odpověď, která by vedla k odvržení implantátu. Kosterní svalovina v místě defektu vykazovala přítomnost myotub, které značí probíhající přestavbu svalové tkáně. Histologická analýza odhalila novotvořené cévního zásobení v místě skafoldu (na následujících obrázcích naznačeno *).

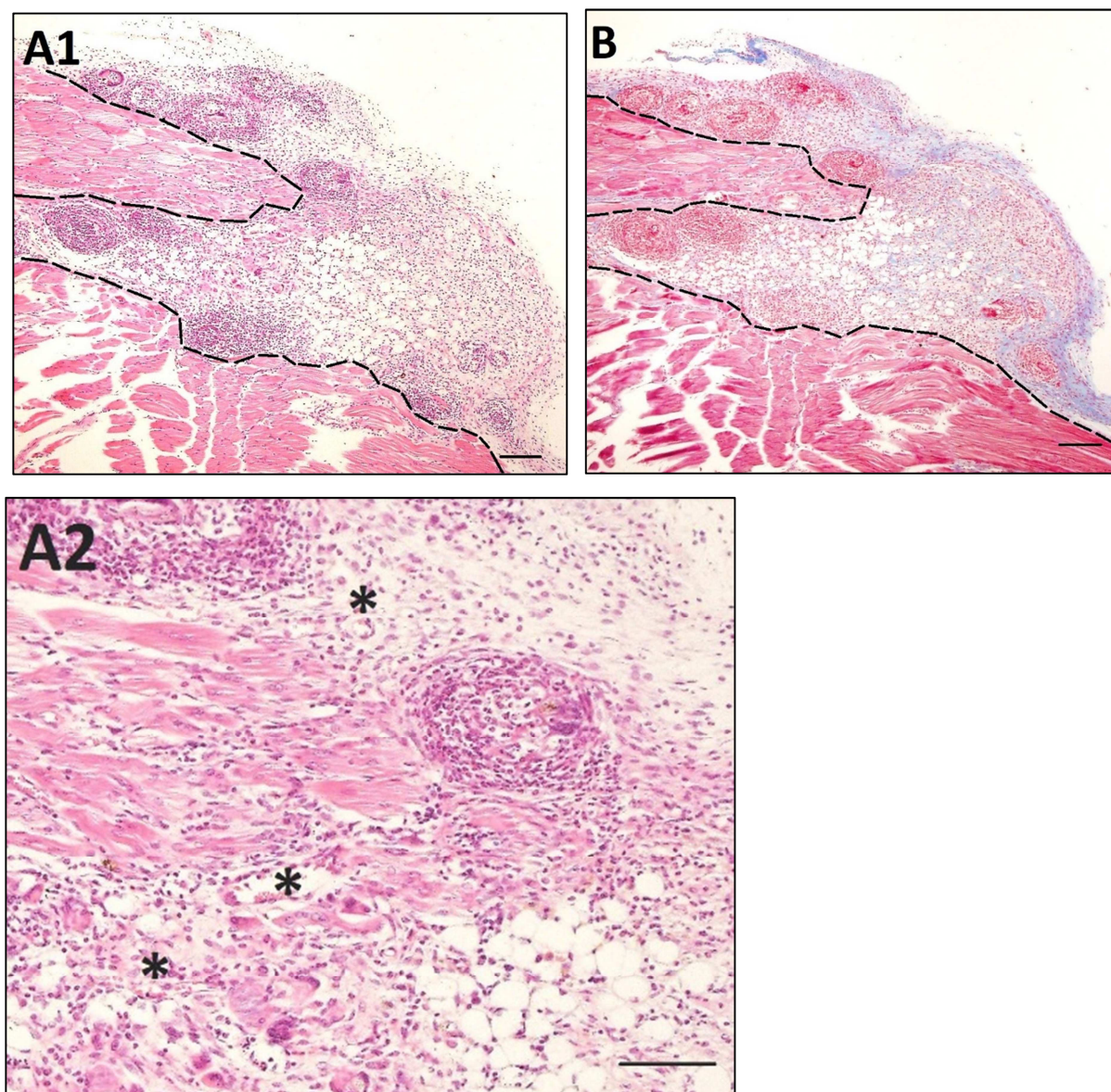
Po prvním týdnu od implantace (obr. 18A) jsem analyzovala přítomnost myotub v místě kontaktu skafoldu s kosterní svalovinou; skafold také obsahoval novotvořené cévní zásobení. Regenerace kosterní svaloviny byla demonstrována imunohistochemicky díky přítomnosti nestin pozitivních myotub (obr. 18C). Skafold nevykazoval přítomnost obrovských buněk z cizích těles. Barvení modrým trichromem odhalilo nahromadění vazivové tkáně ve skafoldu (obr. 18B).



Obr. 18: Skafoldy jeden týden po implantaci. Přehledné zvětšení barvené HE (A1) zobrazuje celý skafold přilehlý ke kosterní svalovině. Detailní zvětšení barvené HE (A2) zachycuje myotuby vcestovalé do skafoldu. Také je zde možné pozorovat cévní zásobení. Konkrétní umístění skafoldu je pozorovatelné díky modrému trichromu (B).

Imunohistochemické zhodnocení přítomnosti nestinu ve skafoldu odebraném jeden týden po implantaci (C). Pozitivní jsou vlákna v blízkosti skafoldu, která kopírují tvar skafoldu (dobarveno hematoxylinem); měřítko je 100 μm .

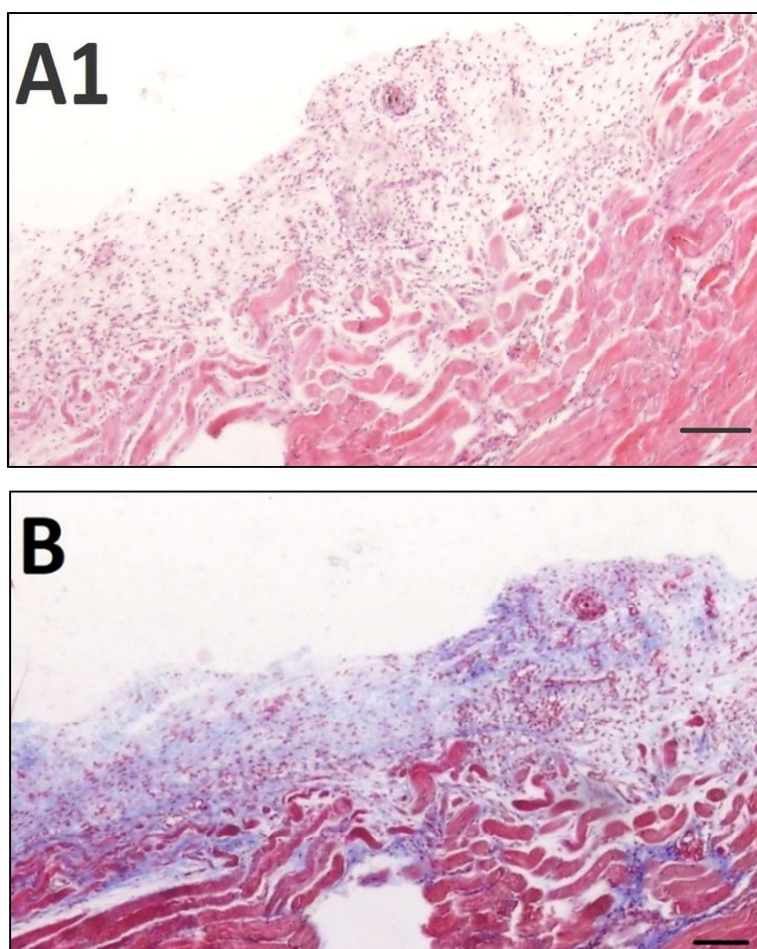
Druhý týden po implantaci (obr. 19) jsem opět pozorovala bohatou buněčnou infiltraci, ovšem nyní již s přítomností obrovských buněk z cizích těles, značící probíhající zánětlivou reakci. Přesto jsem při odběru nepozorovala žádné pohybové omezení zvířete s implantovaným skafoldem. I v případě druhého týdne po implantaci jsem nacházela v místě kontaktu skafoldu s kosterní svalovinou myotuby a cévní zásobení (označeno *, obr. 19A2).

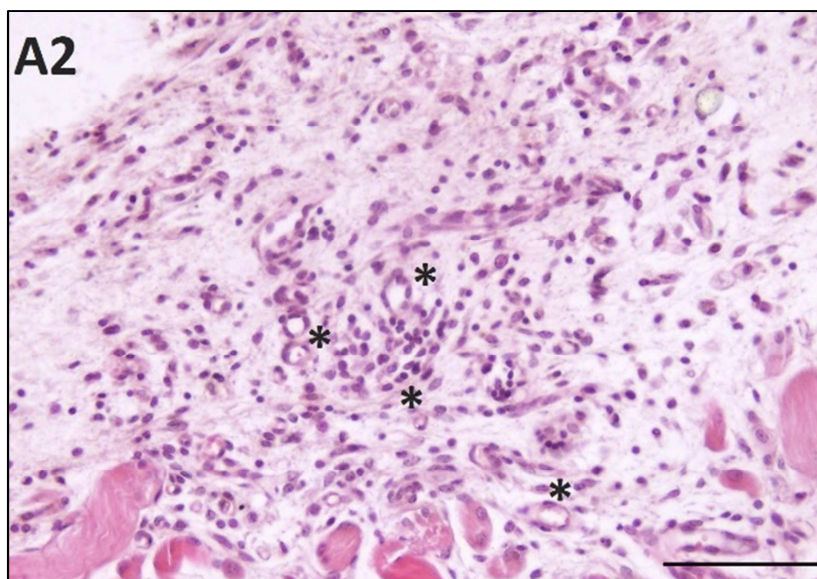


Obr. 19: Skafoldy dva týdny po implantaci. Přehledové zvětšení barvené HE na obrázku A1 zobrazuje celý skafold přilehlý ke kosterní svalovině (ohraničeno přerušovanou čarou). Můžeme zde pozorovat bohatou buněčnou infiltraci ve skafoldu s výskytem větších

skupin buněk, vytvářejících útvary podobné lymfatickým folikulům. Na detailním zvětšení barveném HE můžeme identifikovat i vytvořené cévní zásobení označené * (A2). V místě kontaktu skafoldu s kosterní svalovinou se vyskytuje pár myotub s centrálně lokalizovanými jádry. Modrý trichrom (B) znázorňuje umístění skafoldu v těsném kontaktu s kosterní svalovinou, která se nachází na spodní třetině obrázku (označeno přerušovanou čarou); měřítko je 100 μ m.

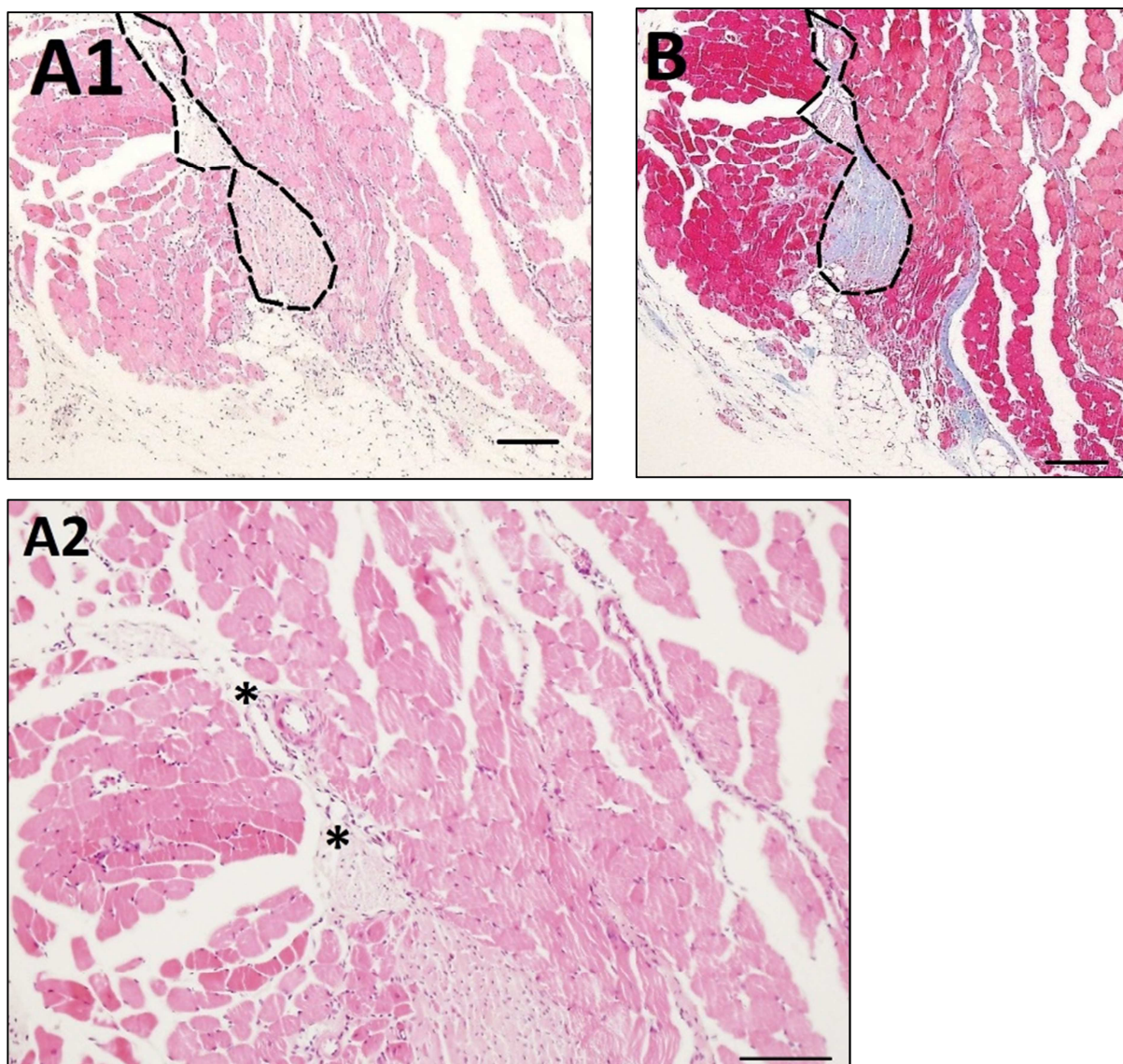
Třetí týden po implantaci (obr. 20) byl skafold recelularizován migrovanými buňkami, ale počet byl nižší než v předchozích dvou týdnech. Ovšem došlo k většímu propojení skafoldu s přilehlou kosterní svalovinou s výraznou přítomností myotub, díky čemu není možné zcela přesně odlišit umístění skafoldu. Vzhledem k postupné přestavbě kosterní svaloviny, probíhající ve vlnách, se dá očekávat přítomnost myotub i v pozdějších stádiích implantace. Přítomné buňky nevykazovaly větší počet jader, ale byly pouze mononukleární. Nalezli jsme také cévní zásobení stejně jako v předchozích implantačních obdobích. Barvení modrým trichromem nabízí lepší přehlednost umístění skafoldu částečně propojeného s kosterní svalovinou (obr. 20B).





Obr. 20: Implantované skafoldy třetí týden po vytvoření defektu. Skafold se výrazněji začlenil do přilehlé kosterní svaloviny, což je patrné díky většímu propojení kosterní svaloviny a implantovaného skafoldu (A1, B). Přesto zde není tak výrazná buněčnost jako v předchozích dvou případech. Hvězdičkou je označeno vytvořené cévní zásobení skafoldu (A2). Na obrázcích A jsem použila barvení HE, obrázek B je barvený modrým trichromem; měřítko 100 μm .

Po čtyřech týdnech od implantace decelularizovaného skafoldu (obr. 21) došlo k výraznému začlenění implantátu do okolní svaloviny bez přítomnosti zánětlivé reakce. I zde jsem pozorovala vytvoření cévního zásobení skafoldu a přítomnost myotub, ale už ve výrazně nižším množství a lokalizované pouze v přilehlé kosterní svalovině, bez začlenění do implantátu. Přítomnost skafoldu je zvýrazněna prostřednictvím specifického barvení modrým trichromem (obr. 21B).



Obr. 21: Skafoldy po 4 týdnech od implantace do zvířete. Skafold je z jedné části dobře začleněn do kosterní svaloviny, což je lépe pozorovatelné na barvení modrým trichromem (ohraničeno přerušovanou čarou, B). Buněčnost je opět nižší než v prvních dvou týdnech od implantace. I zde je možné pozorovat cévní zásobení skafoldu (A2) znázorněné pomocí hvězdičky. Řezy na obrázcích A jsem obarvila HE; měřítko 100 μm .

6. DISKUZE

Pokrok a vývoj v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství poskytuje nové možnosti léčby poškozených či zcela chybějících tkání. Jako nástroje těchto technologií se často používají biomateriály. Jedním z mnoha materiálů je také tkáňově specifická struktura, extracelulární matrix, jejíž architektonika má stejné uspořádání jako daná tkáň. Poškozené svalové tkáně jsou vhodným modelem pro rekonstrukce vzhledem k jejich pozitivní interakci s biomateriály (Turner et al. 2010; Valentin et al. 2010; Wang et al. 2017). Proto se tato studie zabývá tvorbou extracelulární matrix kosterní svaloviny a jejímu následnému použití pro rekonstrukci svalového poškození na zvířecím modelu.

Decelularizace je jednou z metod produkce ECM a zaměřuje se na odstranění buněk z tkáně, zachování struktury a biochemických vlastností tohoto materiálu. Existuje velké množství přístupů, přičemž téměř každý decelularizační protokol obsahuje odlišná agens. Přesto se zde objevuje určitá spojitost, a to z hlediska kombinace fyzikálních, chemických a biologických agens s rozdílným působením na tkáň. Samotný výběr konkrétní metody závisí na povaze zpracovávaného materiálu, na jeho denzitě, morfologii a velikosti. Prvním popsáním pokusem o decelularizaci kosterní svaloviny byla studie Carlsona (1991), který vystavil kosterní svalovinu působení roztoku EDTA s Tritonem X-100, následně aplikoval DNázu a posledním krokem bylo použití deoxycholátu sodného, který měl za úkol odstranit zbytky poškozených buněčných komponent. Tento protokol byl dále převzat a modifikován dalšími studiemi (Gillies et al. 2011; Gamba et al. 2002). Moje studie se také řídila obecným postupem vycházejícím z literárních řešerší, přesto vytvořený protokol pro decelularizaci kosterní svaloviny je zcela originální. Svalová tkáň byla vystavena působení osmotického šoku vyvolaného kombinací hypertonického a hypotonického roztoku, čímž dochází ke změně velikosti buňky, kdy se v prvotní hypertonické fázi zbavuje intracelulární vody a naruší se stabilita proteinů cytoplazmatické membrány (Stadtmiller et al. 2017). Aplikace hypotonického roztoku naopak přetíží buněčné transportní systémy čerpající molekuly vody dovnitř buňky, což vyvolá otok, následné protržení buněčné membrány a uvolnění obsahu.

Tento krok připraví tkáň na hlavní decelularizační agens, dodecyl sulfát sodný (SDS), který účinně naruší membránové i intracelulární proteiny a dokáže přerušit peptidové vazby (Seddon et al. 2004). Navíc je efektivním agens pro lýzu stěny bakterií, čímž plní dvojí funkci – decelularizační a baktericidní. SDS a Triton X-100 jsou dva nejčastěji používané detergenty pro decelularizaci, ale efektivita působení Tritonu X-100 na kosterní svalovinu je

nesrovnatelná s výsledkem působení SDS na stejnou tkáň, což jsem prokázala ve své studii, zabývající se srovnáním těchto dvou agens (Hřebíková et al. 2016). Triton X-100 zachoval extracelulární matrix kosterní svaloviny, ale nedokázal efektivně odstranit buněčný materiál z tkáně, proto je možné konstatovat, že toto agens je vhodnější pro méně komplexní tkáň nebo jej lze použít pro odstranění tukové tkáně (Crapo et al. 2011). Naproti tomu při použití SDS standardní i speciální histologické metody prokázaly úspěšnou eliminaci buněčného materiálu z tkáně a stejně tak i zachování prostorového uspořádání ECM kosterní svaloviny. Použití SDS není vždy bez negativních dopadů na tkáň; je nutné zkrátit dobu působení pod 72 hodin, aby nedošlo k nenávratnému poškození prostorového uspořádání matrix (Qing and Qin 2009); také může jeho působením dojít ke snížení koncentrace glykosaminoglykanů, případně může dojít i k poškození kolagenu (Gilbert et al. 2006). Ovšem v případě mého experimentu jsem prostřednictvím elektronové mikroskopie prokázala zachování kolagenu v jeho neporušené podobě.

Některé studie (Gillies et al. 2011) poukazují na škodlivost enzymatických agens při decelularizaci, protože mohou vážně poškodit kolagen, jehož nedostatek způsobí zborcení tkáně, vzhledem k jeho strukturální funkci. Také dochází k odstranění glykoproteinů, jako je laminin nebo fibronectin, poškození elastinu a snížení koncentrace glykosaminoglykanů. Tyto nežádoucí vlastnosti jsou přisuzovány především trypsinu a jeho použití se omezuje na kratší časové intervaly. Tato studie se z hlediska enzymatických agens omezila na použití DNázy pro snížení hodnoty DNA pod 50 ng na 1 mg tkáně, což je nepsaný limit DNA, který může být přítomen v tkáni bez rejekce implantátu (Crapo et al. 2011; Garreta et al. 2017). Výsledná hodnota DNA ve vytvořeném skafoldu dosáhla hodnoty 3,1 ng DNA na 1 mg tkáně.

Vyvolání imunitní reakce po implantaci biomateriálu do hostitele může vyústit v odvržení implantátu. Výše zmíněná redukce DNA, případně úplná eliminace, je zásadním kritériem pro snížení rizika odvržení implantátu. Ovšem nejen přítomnost cizorodé DNA je jedinou příčinou rejekce; neshoda v histokompatibilním systému příjemce a dárce ovlivňuje mechanismy nespecifické imunity, která je zprostředkována cytotoxickými T-lymfocyty a dochází tak k akutní rejekci štěpu. Vzhledem k odstranění buněk z biomateriálu není možné pozorovat akutní rejekci po implantaci skafoldu do zvířete. Ovšem v případě chronické rejekce dochází k vytvoření zánětlivé reakce vůči endotelovým buňkám štěpu, následně ke ztrátě průchodnosti cévního řečiště a zvazivovatění parenchymu štěpu (Krejsek a Kopecký 2004). I tato varianta rejekce není závažným rizikem zvažovaným při implantaci skafoldu, a to opět díky absenci původního vaskulárního řečiště a přítomnosti pouze jeho opěrné

struktury. Navíc extracelulární matrix získaná během procesu decelularizace obsahuje komponenty, které jsou konzervovány mezidruhově, tudíž i v případě xenogenní implantace skafoldu je nízké riziko rejekce (Bernard et al. 1983; Exposito et al. 1992; Raspanti et al. 2018).

Rejekce implantátu může být také způsobena nedostatečně vyplaveným decelularizačním agens ze skafoldu (Gilbert et al. 2006), přičemž rezidua agens se stávají cytotoxickými, a to především v případech jejich vyšších koncentrací přítomných ve skafoldu. Toto riziko se dá výrazně redukovat vyplavením agens za pomoci izotonických pufrů, které jsem použila jak mezi jednotlivými kroky protokolu, tak jako promývací cyklus v posledním kroku protokolu.

Nespornými výhodami použití biomateriálu připraveného pomocí decelularizačních metod jsou tedy biokompatibilita, zachování prostorového uspořádání, redukce imunologické rejekce, zachování konstruktu cévního a nervového zásobení. Právě zachování struktury cévního zásobení zvýší pravděpodobnost migrace endotelových buněk do skafoldu *in vivo*, což může pozitivně ovlivnit neovaskularizaci skafoldu a nepřímo podpořit funkčnost biomateriálu (Criswell et al. 2013; Fu a Wang 2018; Porzionato et al. 2015). Kolonizace skafoldu endotelovými buňkami a následná novotvorba cévního zásobení je významně ovlivněna růstovými faktory, především VEGF. Ve studiích Germaniho et al. (2003) a Ochoy et al. (2007) recelularizovali skafold endotelovými buňkami a myogenními progenitorovými buňkami, přičemž se prokázalo, že obě buněčné linie jsou schopny produkce VEGF, která podpořila jak angiogenezi, tak i migraci myogenních progenitorů.

Zajištění cévního zásobení štěpu je esenciálním krokem pro úspěšnou remodelaci místa poškození. Dalším klíčovým krokem, který výrazně zvyšuje funkčnost a potenciál vytvořeného biomateriálu je inervace *de novo*. Vzhledem k tomu, že námi vytvořený skafold již obsahuje extracelulární matrix nervového zásobení, je zde vyšší pravděpodobnost obnovení inervace materiálu. Některé studie se zaměřily na vytvoření neuromuskulární spojení jak *in vitro* (Das et al. 2010) a *in vivo* (Kang et al. 2012). Studie Dase dokumentuje dlouhodobou kokultivaci fetálních motoneuronů a myoblastů potkana, přičemž se pozoroval účinek různých růstových faktorů a hormonů. Po 30 – 40 dnech od společné kultivace došlo k diferenciaci myotub, které byly funkčně spojeny s axony pomocí neuromuskulárního ploténky. V případě studie Kanga došlo k odstranění *n. ischiadicus*, který byl nahrazen *n. peroneus communis*. Transplantát po 12 týdnech dokázal regenerovat neuromuskulární defekt vytvořený po odejmutí *n. tibialis* a částečně obnovil funkci denervovaného *m. gastrocnemius*.

Vytvořený protokol splňuje kritéria úspěšné decelularizace ve všech bodech, což jsme potvrdili velkým množstvím morfologických a biochemických metod, kdy jsme prokazovali zachování jednotlivých komponent tvořících extracelulární matrix.

Nejvíce zastoupeným proteinem ECM je kolagen, který se zde vyskytuje téměř v 90% suché váhy (Badylak et al. 2015; Hussey et al. 2018). Jeho zachování v průběhu decelularizace má vysokou prioritu vzhledem ke strukturní funkci zastávající v ECM. V případě poškození ultrastruktury nebo při kritickém snížení jeho obsahu v biomateriálu dochází k narušení soudržnosti celého skafoldu, změně tvaru, snížení odolnosti vůči mechanickému zatížení, a také se snižuje adheze kmenových buněk během recelularizace. Kosterní svalovina má kolagen soustředěn především v jeho obalových strukturách (endomyzium, perimyrium a epimyrium) a ve šlachách. Přítomnost kolagenu v připraveném skafoldu byla prokázána několika histologickými metodami a jeho kvantifikace proběhla metodou hydroxyprolinové analýzy. Standardní barvení hematoxylin eosinem prokázalo zachování struktury matrix, která po odstranění svalových vláken připomíná šestihran tvořený endomyziem, nacházejícím se na periferii původních svalových vláken. Specifická barvení pro kolagenní vlákna jsou například Massonovy trichromy a barvení siriovou červení, přičemž obě použité metody prokázaly jejich zachování beze změn v distribuci, denzitě či struktuře.

Množství zachovaného kolagenu bylo zkoumáno nejrozšířenější kvantitativní analýzou, hydroxyprolinovou metodou. 4-hydroxyprolin je esenciální aminokyselina pro kolagen, která je zde zastoupena v přibližně 14 %. Přítomnost hydroxyprolinu ve struktuře kolagenu je zásadní především pro stabilizaci celého proteinu. Mnou analyzované vzorky skafoldu a kontrolního vzorku neošetřené kosterní svaloviny vykazovaly značně odlišné koncentrace kolagenu. Ukázalo se, že skafold obsahoval téměř čtyřnásobné množství kolagenu oproti intaktnímu vzorku. Vysvětlení tohoto rozdílu je v odstranění intracelulárních proteinů během decelularizace a zvýšené množství kolagenu ve skafoldu je odrazem této eliminace, což potvrdila i studie Bollanda (Bolland et al. 2007).

Ovšem kvantitativní analýza není relevantním ukazatelem zachování ultrastruktury kolagenu. Morfologii kolagenních fibril jsem zkoumala pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Tropokolagenové podjednotky kolagenních fibril jsou společně se sousedními podjednotkami uspořádány v opakující se úseky, přičemž mezi sebou nechávají štěrbiny. Toto uspořádání se projevuje jako příčné žláhání kolagenních fibril typické především pro kolagen typ I (Shoulders a Raines 2009). Právě toto periodické opakování tropokolagenových

podjednotek, vytvářející žíhání kolagenních fibril jsem pozorovala během analýzy elektronogramu skafoldu. Zachování terciární struktury tropokolagenu umožňuje mechanickou odolnost kolagenních vláken a je dalším potvrzením efektivity používaného protokolu.

Mimo kolagen I jsem prokázala přítomnost dalšího typu kolagenu, konkrétně kolagenu typu IV, který je esenciálním proteinem bazální membrány, kde tvoří téměř 50 % z celkového množství strukturálních proteinů (Kalluri 2013). Kolagen IV je nezbytný pro zachování integrity a funkce bazální membrány, především z hlediska mechanické opory, dále na filtraci a lokálně dokáže „skladovat“ růstové faktory (Cosgrove a Liu 2017; Pöslch et al. 2004). Tento subtyp kolagenu je také zapojený do inkorporace lamininu, nidogenu a perlekanu, čímž vytváří síťovitou matici bazální membrány, a také se podílí na procesech buněčné adheze a signalizace (Chioran et al. 2017). Vzhledem k výše uvedeným funkcím tohoto proteinu je jeho přítomnost v tkáni vysoce žádoucí a průkaz jeho přítomnosti ve vzorku je známkou neporušenosti bazální membrány. V imunohistochemické analýze byla potvrzena přítomnost tohoto proteinu, a to konkrétně jako pozůstatek bazální laminy svalového vlákna (laminy externy), v endotelové vrstvě cévního zásobení a v okolí nervových vláken. Zachovalé cévní a nervové zásobení postrádalo buněčnou komponentu, přesto nedošlo k rozrušení bazální membrány. Takto rozsáhlý nález intaktních bazálních membrán značí dostatečně účinný, ale přesto šetrný decelularizační protokol.

O neporušenosti bazální membrány svědčí také přítomnost lamininu, který je její nedílnou součástí. Tento heterotrimerní glykoprotein je podobně jako kolagen typu IV zapojený do buněčné adheze, signalizace, a také napomáhá migraci (Durbeej 2010; Simon a Bromberg 2017). Laminin se vyskytuje v izoformách specifických pro daný typ tkáně (pro svalovou tkáň je to například LM-211 a LM-111) a ty pak mohou ovlivnit regeneraci. Například izoforma LM-111 byla experimentálně využita při terapii, kdy se po intramurální injekci této izoformy signifikantně podpořila transplantace myoblastů u myši se svalovou dystrofií (Riederer et al. 2015). Transmisní elektronová mikroskopie vytvořeného skafoldu odhalila neporušenost laminy externy, která byla orientována v okolí prázdných tubulárních struktur, jež se zachovaly po odstranění svalových vláken. Přítomnost lamininu se také prokázala pomocí imunofluorescence, kde se laminin vyskytoval jako součást externích lamin, a také pomocí Western blotu. Průkaz proteinů, tvořících hlavní komponenty laminy externy, umožňuje předpoklad vytvoření vhodné matrice pro recelularizaci buňkami

s regeneračním a proliferačním potenciálem, jejichž vlastnosti mohou být podpořeny právě těmito proteiny.

Primárním cílem této práce je především příprava vhodného biomateriálu s následnou recelularizací kmenovými buňkami, čímž by byla možná terapie ztrát svalové tkáně ve velkém objemu. Výsledky evaluace vytvořeného protokolu vedly k analýze biokompatibility materiálu, která byla prokázána *in vitro* a následně i *in vivo*, kdy jsem decelularizovaný skafold implantovala přímo do místa poškození. Některé studie se odkazují i na heterotopickou implantaci, kdy se decelularizované tkáně implantují do poškozené tkáně jiného původu (Li et al. 2017; Toeg et al. 2013). Přestože tyto studie vykazují určité benefity, převážná většina studií se zaměřuje na využití homologního místa implantace, a tím dokážou vytěžít výhody tkáňově specifické ECM s typickou architekturou. Ovšem před samotnou implantací skafoldu do místa poškození, jsem nejprve zkoumala cytokompatibilitu, kdy jsem skafold recelularizovala za použití několika buněčných linií.

Vzhledem k velikosti připraveného skafoldu jsem jako metodu recelularizace zvolila injekční vpich přímo do skafoldu. Použití bioreaktoru, perfúze či použití magnetických částic by významně zvýšilo cenu celého recelularizačního procesu, a také by nebyla zcela zaručena efektivita tohoto procesu vzhledem k velikosti skafoldu. Další použitelnou metodou recelularizace se nabízí centrifugace (Godbey et al. 2004). Výhody centrifugace společně s injekčním vpichem jsem porovnávala u buněčné linie C12C12 myoblastů a PP4 pasáže, přičemž jsem použila stejný počet buněk u obou kultur. Po centrifugaci a injekčním vpravení buněk jsem skafoldy kultivovala v médiu po dobu 14 dní, přičemž následné histologické zpracování vyšlo ve prospěch metody injekčního vpichu. Tudíž jsem se při ověřování cytokompatibility držela dat dosažených touto metodou.

C2C12 myoblasty jsou odvozeny ze satelitních buněk, rezidentních buněk kosterní svaloviny, které jsou schopny se po snížení koncentrace séra v kultivačním médiu diferencovat v mnohobuněčné myotuby. Nediferencované myoblasty této linie mají vřetenovitý nebo hvězdovitý tvar a exprimují aktin a nevyzrálý myosin. Během myogenní diferenciace mění svůj tvar na podlouhlý a myoblasty formují monolayer. V sarkoplasmě probíhá formování Z disku a kotvení aktinových filament do tohoto místa. Také dochází k expresi M-cadherinu, který se zatím ne zcela neobjasněným způsobem podílí na sestavování myotub. Myotuby se objevují cca 5 dní od snížení koncentrace séra v kultivačním médiu (Burattini et al. 2004). V tomto experimentu byly myoblasty kultivovány v médiu obsahujícím sérum, tudíž jsem neočekávala tvorbu myotub. Myoblasty adherovaly na povrch

skafoldu, čímž se potvrdilo zachování a funkčnost receptorů a ligandů, obsažených v extracelulární matrix skafoldu. Přisedání na povrch skafoldu probíhalo během prvního týdne od kokultivace a v průběhu druhého týdne došlo i k migraci myoblastů do nitra skafoldu. Je tedy možné předpokládat, že myoblasty byly během této kultivace zcela funkční a můžeme vyloučit toxický či inhibiční vliv skafoldu na buňky. Myoblasty také nevykazovaly morfologické odchylky, polyploidii či jiné patologické jevy. Standardní histologické barvení jsem doplnila o histochemickou analýzu s cílem prokázat zachování aktinu, jakožto podstatné součásti cytoskeletu buněk, zajišťující jejich tvar, pohyb a (v případě svalových tkání) také kontrakci (Fletcher and Mullins 2010). Také jsem nepozorovala snížení počtu myoblastů či buněčnou smrt. Navíc jsem také prokázala, že jejich proliferační potenciál zůstal zachován, což vede k závěru, že skafold je pro buňky vhodné podpůrné a kompatibilní médium. Použití C2C12 myoblastů v kombinaci s decelularizovaným skafoldem zdokumentovala studie Gilbert-Honick et al. (2018), kdy prokázali úspěšnou *in vivo* regeneraci svalového poškození ve větším objemu.

Kmenové buňky odvozené od kosterní svaloviny (*muscle derived stem cells*, MDS*c*) mají potenciál v diferenciaci v několik fenotypově zcela odlišných buněčných linií. Jejich izolace spočívá v rozdílném přisedání na kolagen či Matrigel. V průběhu postupné adheze buněk lze snadno izolovat jednotlivé buněčné linie, přičemž první pasáž (PP1) obsahuje především vyzrálé buňky jako jsou fibroblastům podobné buňky. Následující pasáž (PP2) je už obohacena o přítomnost myoblastů ve směsi s fibroblasty obsažených i v předchozí pasáži. Vzhledem k tomu, že tyto dvě pasáže jsou izolovány v průběhu několika hodin, hovoří se o nich jako o rychle adheřujících liniích. Další pasáže jsou izolovány v průběhu dnů a buňky v nich obsažené patří mezi pomaleji adheřující jako je tomu například u buněk ve třetí pasáži, která kromě myoblastů a fibroblastů obsahuje i satelitní buňky. Přítomnost MDS*c* je pozorována až v páté (PP5), případně šesté pasáži (PP6), kde jsou ve směsi se satelitními buňkami (Wu et al. 2010). Právě tyto buňky jsou schopny se vyvíjet v buňky mezenchymového původu, mohou z nich tedy vznikat buňky s myogenním, hemopoetickým, chondrogenním, osteogenním a endotelovým fenotypem (Usas a Huard 2007). Já jsem použila pasáže PP6 a PP4, kde se nachází část myoblastů a fibroblastů; právě různorodost PP4 pasáže reflektuje buněčnou rozmanitost, která se přirozeně ve svalovině nachází. U pasáže PP4 byly výsledky recelularizace částečně shodné s populací C2C12 myoblastů. V prvním týdnu došlo k adhezi buněk na povrch skafoldu, v druhém týdnu byla pozorována migrace buněk do skafoldu. Tyto společné znaky se ale rozcházejí v množství adheřovaných a vcestovalých

buněk, kdy u čisté populace C2C12 myoblastů jsem pozorovala větší množství buněk oproti heterogenní populaci PP4. V tomto případě je nejspíše na vině nízký počet buněk zvolený pro recelularizaci. Přesto jsem nepozorovala žádné morfologické změny. Homogenní linie MDSc (PP6) se obtížněji kultivuje a konfluence dosahuje značně později, než je tomu v případě PP4 pasáže, tudíž dosažení dostatečného počtu buněk není snadnou záležitostí. Z tohoto důvodu jsem očekávala nižší počty buněk jak adherovaných, tak vcestovalých do skafoldu. Potvrdily to histologické řezy z obou týdnů, kdy jsem pozorovala adhezi i migraci buněk do skafoldu, ale v nízkých počtech. Přesto skafold žádným způsobem nenarušil morfologii těchto buněk, tudíž největší výzvou je spíše kultivace většího počtu buněk a následná úprava kultivačních podmínek, které by podpořily diferenciaci a tvorbu myotub.

V laboratoři kmenových buněk našeho ústavu se také věnujeme kultivaci pluripotentních buněk. Velice slibné výsledky poskytují indukované pluripotentní kmenové buňky, jež jsme připravili reprogramováním fibroblastů nebo dentálních kmenových buněk pomocí CytoTune-iPS Sendai reprogramovacího kitu (Pisal et al. 2018). Pro řízenou diferenciaci iPS buněk v Pax7⁺ buňky a myogenní progenitory je klíčové ošetření pluripotentních buněk GSK-3 inhibitorem CHIR99021, který dokáže modifikovat signální dráhu Wnt. Po následujících dvanácti dnech jsou buňky vystaveny vlivu růstového faktoru FGF2 podporujícím buněčnou proliferaci a jejich nasměrování ve vývoj buněk z mesodermální vývojové linie, konkrétně v buňky kosterní svaloviny. Po dvaceti dnech buňky exprimují myogenní regulační faktory jako MRF a myogenin, což koresponduje s buňkami časného dermomyotomu. Po dvou měsících kultura obsahuje velké množství myogenních progenitorů a menší počet myoblastů. Fenotyp kultivovaných buněk byl ověřen imunocytochemií a RT-PCR, přičemž byla potvrzena exprese Pax7. Tento protein je považován za specifický marker pro adultní satelitní kmenové buňky a hraje klíčovou roli v jejich přežívání a proliferaci, čímž se v podstatě podílí na regeneraci kosterní svaloviny (Brack 2014). Myogenní progenitorové buňky se ukázaly jako vhodná buněčná linie k recelularizaci vzhledem k několika vrstvám buněk na povrchu skafoldu, tak dle vcestovalých buněk, které migrovaly do centra skafoldu v místech předešlých kosterních svalových vláken. Složení kultivačního média jsem neměnila, abych využila potenciál skafoldu jakožto podpůrného konstruktu pro adhezi a migraci buněk. Tato populace myogenních progenitorů vykazovala expresi myogeninu a Pax3 testovanou pomocí imunofluorescence. Průkaz myogeninu, jakožto proteinu zapojeného do myogeneze, je potvrzením zachování diferenciačního potenciálu ve svalové buňce (Zammit 2017). Funkce Pax3 je také spjata

s myogenezí a obecněji s vývojem tkání různých druhů. Oba tyto proteiny tedy prokazují zachování fenotypu myogenních progenitorových buněk (Buckingham and Relaix 2015). Co se týká morfologie buněk, tak opět nebyly pozorovány strukturní odchylky. Preklinická studie Darabiho potvrzuje, že použití myoblastů a mezenchymálních kmenových buněk diferencovaných z iPS buněk zvyšují regenerační potenciál štěpu (Darabi et al. 2012).

Cytokompatibilitu skafoldu jsem také ověřovala experimentem *in vivo*, kdy jsem připravený skafold implantovala do zvířete. Nejprve jsem provedla odběr části *m. tibialis anterior* a do místa jsem vložila decelularizovaný skafold stejného svalu. Posléze jsem odebrala *m. tibialis anterior* společně s vhojeným skafoldem, a to ve 4 časových intervalech, abych porovнала *in vitro* a *in vivo* recelularizaci. Vybraná zvířata byla histokompatibilní s připraveným skafoldem, přestože by bylo možné skafold implantovat i do zvířete, které by tyto podmínky nesplňovalo, a to především díky odstranění MHC molekul exprimovaných na povrchu buněk. Histologické analýze odebraných implantátů předcházelo zhodnocení rekonvalescence zvířat. Ani u jediného zvířete nedošlo ke snížení či ztrátě pohyblivosti, nezaznamenala jsme úhyn v souvislosti s provedenou operací. Během odebírání vzorku se skafoldem jsem pozorovala začlenění skafoldu do okolní svalové tkáně a kompletní zhojení povrchové svalové povázky.

Skafoldy v různých intervalech odběru vykazovaly odlišné výsledky, týkající se především jejich postupnému začlenění do přilehlé svaloviny. Pouze v jednom případě jsem pozorovala vytvoření zánětlivého infiltrátu, vykazujícího morfologii primárních lymfatických uzlíků. Zánětlivý infiltrát v podobě obrovských buněk z cizích těles byl popsán také ve studii Lin et al. (2014), který dokumentuje přítomnost především CD68 pozitivních buněk, jejichž množství pozvolna ubývalo od 10. do 30. dne od implantace skafoldu z *m. latissimus dorsi*. Ovšem zánětlivá infiltrace, respektive migrace monocytárních krevních elementů, je vysoce žádoucí vzhledem k postupnému odbourávání skafoldu, díky čemuž dochází k uvolňování degradačních molekul, stimulujících chemotaxi progenitorových buněk do místa implantátu (Badylak et al. 2016). První buněčnou linií, která se významně podílí na degradaci skafoldu jsou především makrofágy (Valentin et al. 2009), které začínají rozkládat skafold, přičemž důvodů pro postupnou degradaci implantovaného materiálu je hned několik. Implantovaný biomateriál se postupně stává méně mechanicky odolným; dále se perzistující skafold může stát ložiskem vzniku chronické zánětlivé reakce a významně tak snížit remodelaci postižené tkáně (Badylak et al. 2016). Ovšem tím nejdůležitějším faktorem pro degradaci skafoldu je uvolnění degradačních molekul (tzv. matricryptic peptides), které vznikají štěpením některých

makromolekul jako je například kolagen, a tyto odpadní produkty mohou zneškodnit bakterie (Brennan et al. 2006), jsou protizánětlivé, protože mohou ovlivnit fenotyp makrofágů (Sicari et al. 2014) a v neposlední řadě dokážou zprostředkovat výše uvedenou chemotaxi kmenových a progenitorových buněk. Tyto degradační látky mohou ovlivnit migraci myogenních progenitorů *in vitro* (Reing et al. 2010), Sox²⁺ buněk (Agrawal et al. 2012) nebo perivaskulárních kmenových buněk *in vivo* a *in vitro* (Tottey et al. 2011a; Tottey et al. 2011b). Perivaskulární kmenové buňky (PVSc) se nacházejí v klidovém stavu, ovšem po jejich aktivaci se stávají multipotentními a diferencují se v buňky s chondrogenním, osteogenním, případně myogenním potenciálem (Crisan et al. 2008). PVSc jsou lokalizovány v okolí kapilár, kde regulují vazokonstrikci, ovšem pokud se transplantují do místa svalového poškození, jsou schopné se diferencovat v myoblasty (Crisan et al. 2012). Tímto se zvyšuje regenerační potenciál skafoldu.

V těsném kontaktu skafoldu a kosterní svalové tkáně jsem prokázala přítomnost myotub s centrálně lokalizovanými jádry. Dokonce jsem prokázala expresi nestinu ve skafoldu odebraném týden po implantaci. Nestin, zástupce intermediálních filament, reguluje počátek myogenní diferenciace prostřednictvím signální dráhy Cdk5 kinázy (Lindqvist et al. 2017). Jeho prokázaná exprese v kosterní svalovině tudíž značí regeneraci svalových vláken. Myotuby lokalizované v těsné blízkosti skafoldu a kosterní svaloviny také popsala studie Merritta et al. (2010), který implantoval decelularizovaný *m. gastrocnemius* do myši. Po 30 dnech od implantace pozoroval přítomnost myotub a novotvořeného cévního zásobení v blízkosti skafoldu, což přisuzoval chemotaktickému působení degradačních molekul uvolňovaných z implantované extracelulární matrix svalové tkáně. Úplná přestavba implantovaného decelularizovaného skafoldu byla popsána ve studii Valentina et al. (2010), který dokumentuje novotvorbu svalových vláken, jejichž funkčnost byla srovnatelná s intaktní kosterní svalovinou. Štěp byl implantován po dobu 26 týdnů, během kterých došlo k vytvoření svalových vláken uspořádaných do svazků, obalených vazivovou tkání v podobě epimyzia s novotvořeným cévním řečištěm a nervovými vlákny. Naproti tomu studie Turnera et al. (2010), u které probíhal *in vivo* experiment přibližně stejnou dobu (6 měsíců), popsala zlepšení funkce poškozeného *m. gastrocnemius* o cca 40 % oproti kontrolnímu svalu stejného druhu. I přestože funkce nebyla obnovena v plné šíři, byla prokázána přítomnost novotvořeného cévního zásobení, svalových a nervových vláken. Obě tyto studie částečně korelují s námi dosaženými výsledky, a to především v recelularizaci autologními buňkami

hostitelského zvířete, přítomností cévního zásobení štěpu, integrací skafoldu do okolní tkáně, přítomností vazivové tkáně a postupnou přestavbou implantátu.

Prokázaná cytokompatibilita *in vitro* se potvrdila i v experimentu *in vivo*, a to ve všech intervalech. Ovšem docházelo k postupnému snižování počtu migrovaných buněk do skafoldu, což lze vysvětlit díky pozvolné přestavbě skafoldu a remodelaci místa poškození. V časovém úseku několika týdnů není možné postihnout celou přestavbu a degradaci skafoldu, která může trvat i několik měsíců (Badylak et al. 2016; Turner et al. 2010; Valentin et al. 2010). Cílem implantace decelularizovaného skafoldu do zvířete bylo především potvrdit experimentálně zjištěnou domněnku o kompatibilním materiálu, který nebude vyvolávat imunitní reakci a vyvolat následné odvržení implantátu. Vytvořený biomateriál poskytl mechanickou oporu, která se promítla v neomezených pohybových vlastnostech zvířete, došlo k integraci implantátu a přemostění vytvořeného defektu. Tím jsem prokázala efektivitu decelularizačního protokolu a zachování extracelulární matrix *m. tibialis anterior* jak z hlediska strukturního, tak funkčního.

Vytyčené cíle disertační práce byly splněny, dokázala jsem vytvořit biokompatibilní materiál s regenerativními vlastnostmi, který dokáže podpořit buněčnou migraci a adhezi, a to relativně jednoduchou a rychlou metodou s běžným přístrojovým vybavením standardních laboratoří. Díky decelularizaci můžeme studovat extracelulární matrix v různých podmínkách, ať už se jedná o změny během patologických procesů, probíhajících během různých onemocnění, srovnání změn v ECM izolované z mladého a staršího organismu a porovnání jejich regeneračního potenciálu *in vitro* a *in vivo*. Skafoldy kosterní svaloviny jsou tedy bezesporu přínosem pro prohloubení znalostí o extracelulární matrix, které lze využít v regenerativní medicíně, kde tento biomateriál může sloužit k terapii svalových poškození, především v kombinaci s vhodnými buněčnými liniemi.

7. ZÁVĚR

Tato disertační práce byla zaměřena především na přípravu materiálu, který lze dále využít pro remodelaci poškozené kosterní svaloviny. Vytvořený biomateriál by měl být mechanickou podporou, strukturálně se shodovat s kosterní svalovinou, být histokompatibilní s myším organismem, také by měl podpořit buněčnou adhezi a proliferaci a podílet se na regeneraci poškozené svaloviny.

Ideálním kandidátem pro materiál s těmito vlastnostmi se ukázala být extracelulární matrix kosterní svaloviny, kterou lze připravit metodou odstranění buněk, decelularizací. Protokol decelularizace kosterní svaloviny jsem přizpůsobila vlastnostem dané tkáně, abych dosáhla zachování struktury a maximálně efektivně odstranila cytoplazmatický materiál. Právě zachování architektiky extracelulární matrix skafoldu je zásadním krokem, jehož nedodržení se může projevit i ve funkčnosti biomateriálu. Efektivita celého procesu byla potvrzena řadou histologických a biochemických metod, jejíž výběr se shoduje s technikami evaluace decelularizačních protokolů i jiných studií.

Funkčnost skafoldu jsem testovala v podmínkách *in vitro*, abych mohla potvrdit zachování jak architektiky, tak i adhezivních molekul, zajišťujících správné přilnutí buněk. Vytvořený biomateriál vykazoval kompatibilitu se čtyřmi odlišnými buněčnými liniemi s promyogenním charakterem. Recelularizace byla úspěšná především v případě C2C12 myoblastů a myogenních progenitorových buněk diferencovaných z indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Díky ověřené cytokompatibilitě jsem přistoupila k experimentu *in vivo*, kdy jsem předpokládala, že zachované bioaktivní molekuly skafoldu budou hrát roli při remodelaci svalového poškození. Ve všech případech byl skafold bohatě recelularizován, začleněn do okolní kosterní svaloviny, vytvořilo se cévní zásobení, přemostil se vytvořený defekt a zacelelila se poškozená svalová povázka.

Vzhledem k výše dosaženým výsledkům plánuji navazující experimenty, zaměřené na implantaci decelularizovaných a recelularizovaných skafoldů a následném porovnání jednotlivých variant, a také se chci věnovat imunofenotypizaci migrovaných buněk. Dále bych chtěla studovat prodloužit dobu implantovaného biomateriálu a případně zhodnotit jeho degradaci. Ovšem především chci více prostudovat možnosti extracelulární matrix v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství.

8. POUŽITÁ LITERATURA

AGRAWAL V., B. F. SIU, H. CHAO, K. K. HIRSCHI, RABORN E., JOHSON S. A., TOTTEY S., HURLEY K. B., MEDBERRY C. J., BADYLAK S. F. Partial characterization of the Sox2+ cell population in an adult murine model of digit amputation. *Tissue Eng Part A* 2012; 18:1454-63

AFARA I., SINGH S., MOODY H., OLOYEDE A. A comparison of the histochemical and image-derived proteoglycan content of articular cartilage. *Anat Physiol* 2013;03:120-6

AMADO L. C., SALIARIS A. P., SCHULERI K. H., ST JOHN M., XIE J. S., CATTANEO S., DURAND D. J., FITTON T., KUANG J. Q., STEWART G. LEHRKE S., BAUMGARTNER W. W., MARTIN B. J., HELDMAN A. W., HARE J. M. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogenic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11474-9

AMBROSIO F., KADI F., J. LEXELL, G. K. FITZGERALD., BONINGER M. L., HUARD J. The effect of muscle loading on skeletal muscle regenerative potential: an update of current research findings related to aging and neuromuscular pathology. *Am J Phys Med Rehabil* 2009; 88:145-55

AUMAILLEY M., BRUCKNER-TUDERMAN L., CARTER W. G., DEUTZMANN R., EDGAR D., EKBLOM P., ENGEL J., ENGVALL E., HOHENESTER E., JONES J. C., KLEINMAN H. K., MARINKOVICH M. P., MARTIN G. R., MAYER U., MENEGUZZI G., MINER J. H., MIYAZAKI K., PATARROYO M., PAULSON M., QUARANTA V., SANES J. R., SASAKI T., SEKIGUCHI K., SOROKIN L. M., TALTS J. F., TRYGGYASON K., UITTO J., VIRTANEN I., VON DER MARK K., WEWER U. M., YAMADA Y., YURCHENCO P. D. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 2005; 24:326-32

BADYLAK S. F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology* 2004, 12:367-77

BADYLAK S. F., TAYLOR D., UYGUN K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 2011;13:27-53

BADYLAK S. F., FREYTES D. O., GILBERT T.W. Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 2015;23:17-26

BADYLAK S. F., DZIKI J. L., SICARI B. M., AMBROSIO F., BONINGER M. L. Mechanisms by which acellular biologic scaffolds promote functional skeletal muscle restoration. *Biomaterials* 2016;103:128-36

BAIGUERA S., JUNGEBLUTH P., BURNS A., MAVILIA C., HAAG J., DE COPPI P., MACCHIARINI P. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. *Biomaterials*, 2010;31:8931-8

BALLEN K. Umbilical cord transplantation: challenges and future directions. *Stem Cells Transl Med* 2017;6:1312-5

BERNARD M. P., CHU M. L., MYERS J. C., RAMIREZ F., EIKENBERRY E. F., PROCKOP D. J. Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved during evolution. *Biochemistry* 1983;22:5213-23

BERRY S. E. Concise review: mesoangioblast and mesenchymal stem cell therapy for muscular dystrophy: progress, challenges, and future directions. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:91-8

BERTHIAUME F., MAGUIRE T., YARMUSH M. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2011;2:403-30

BOLLAND F., KOROSSIS S., WILSHAW S. P., INGHAM E., FISHER J., KEARNEY J. N., SOUTHGATE J. Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering. *Biomaterials* 2007;28:1061-70

BOSNAKOVSKI D., XU Z., LI W., THET S., CLEAVER O., PERLINGEIRO R. C., KYBA M. Prospective isolation of skeletal muscle stem cells with a Pax7 reporter. *Stem Cells* 2008;26:3194-3204

BOUDKO S. P., ENGEL J., BÄCHINGER H. P. The crucial role of trimerization domains in collagen folding. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:21-32

BRACK A.S. Pax7 is back. *Skelet Muscle* 2014;4:24-9

BRENNAN E. P., REING J., CHEW D., MYERS-IRVIN J. M., YOUNG E. J., BADYLAK S. F. Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix. *Tissue Eng* 2006;12:2949-55

BROWN B. N., BADYLAK S.F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Transl Res* 2014;163:268-85

BUCKINGHAM M., RELAIX F. Pax3 and Pax7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2015;44:115-25

BURATTINI S., FERRI P., BATTISTELLI M., CURCI R., LUCHETTI F., FALCIERI E. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development:morpho-functional characterization. *Eur J Histochem* 2004;48:223-33

BURSAC N., LOO Y., LEONG K., TUNG L. Novel anisotropic engineered cardiac tissues: studies of electrical propagation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:847-53

CARALT M., UZARSKI J. S., IACOB S., OBERGFELL K. P., BERG N., BIJONOWSKI B. M., KIFER K. M., WARD H. H., WANDINGER-NESS A., MILLER W. M., ZHANG Z. J., ABECASSIS M. M., WERTHEIM J. A. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am J Transplant* 2015;15:64-75

CARLSON E. C., CARLSON B. M. A method for preparing skeletal muscle fiber basal laminae. *Anat Rec* 1991;3:325-31

CARVALHO J. L., GOMES D. A., GOES A. M. Characterization of decellularized heart matrices as biomaterials for regular and whole organ tissue engineering and initial in-vitro recellularization with iPS cells. *J Tissue Sci Eng* 2012;11:2-17

CEBOTARI S., TUDORACHE I., CIUBOTARU A., BOETHIG D., SARIKOUCH S., GOERLER A., LICHTENBERG A., CHEPTANARU E., BARNACIUC S., CAZACU A., MALIGA O., REPIN O., MANIUC L., BREYMAN T., HAVERICH A. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. *Circulation* 2011;124:115-23

COLES E. G., GAMMILL L. S. , MINER J. H., BRONNER-FRASER M. Abnormalities in neural crest cell migration in laminin alpha5 mutant mice. *Dev Biol* 2006;289: 218-28

CONVERSE G. L., ARMSTRONG M., QUINN R. W., BUSE E. E., CROMWELL M. L., MORIARTY S. J., LOFLAND G. K., HILBERT S. L., HOPKINS R. A. Effects of cryopreservation, decellularization and novel extracellular matrix conditioning on the quasi-

static and time-dependent properties of the pulmonary valve leaflet. *Acta Biomater* 2012;8:2722-9

CORTIELLA J., NILES J., CANTU A., BRETTLER A., PHAM A., VARGAS G., WINSTRON S., WANG J., WALLS S., NICHOLS J. E. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Eng Part A* 2010;16:2565-80

COSGROVE D., LIU S. Collagen IV diseases: A focus on the glomerular basement membrane in Alport syndrome. *Matrix Biol* 2017;57-58:45-54

COSSU G., BIRESSI S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 2005;16:623-31

CRAPO P. M., GILBERT T. W., BADYLAK S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011;32:3233-43

CRISAN M., YAP S., CASTEILLA L., CHEN C. W., CORSELLI M., PARK T. S., ANDRIOLO G., SUN B., ZHENG B., ZHANG L., NOROTTE C., TENG P. N., TRAAS J., SCHUGAR R., DEASY B. M., BADYLAK S. F., BUHRING H. J., GIACOBINO J. P., LAZZARI L., HUARD J., PÉAULT B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;11:301-13

CRISAN M., CORSELLI M., CHEN W. C., PÉAULT B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med* 2012;16:2851-60

CRISWELL T. L., CORONA B. T., WANG Z., ZHOU Y., NIU G., XU Y., CHRIST G. J., SOKER S. The role of endothelial cells in myofiber differentiation and the vascularization and innervation of bioengineered muscle tissue in vivo. *Biomaterials* 2013;34:140-9

CUNNIFFE G. M., VINARDELL T., MURPHY J. M., THOMPSON E. M., MATSIKO A., O'BRIEN F. J., KELLY D. J. Porous decellularized tissue engineered hypertrophic cartilage as a scaffold for large bone defect healing. *Acta Biomater* 2015;23:82-90

DA PALMA R. K., CAMPILLO N., URIARTE J. J., OLIVEIRA L. V., NAVAJAS D., FARRÉ R. Pressure- and flow-controlled media perfusion differently modify vascular mechanics in lung decellularization. *J Mech Behav Biomed Mater* 2015;49: 69-79

DAHL S. L., KOH J., PRABHAKAR V., NIKLASON L. E. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant* 2003;12:659-66

DARABI R., GEHLBACH K., BACHOO R. M., KAMTH S., OSAWA M., KAMM K. E., KYBA M., PERLINGEIRO R. C. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 2008;14:134-43

DARABI R., BAIK J., CLEE M., KYBA M., TUPLER R., PERLINGEIRO R. C. Engraftment of embryonic stem cell-derived myogenic progenitors in a dominant model of muscular dystrophy. *Exp Neurol* 2009;220:212-6

DARABI R., ARPKE R. W., IRION S., DIMOS J. T., GRSKOVIC M., KYBA M., PERLINGEIRO R. C. Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 2012;10:610-9

DAS M., RUMSEY J. W., BHARGAVA N., STANCESCU M., HICKMAN J. J. A defined long-term in vitro tissue engineered model of neuromuscular junctions. *Biomaterials* 2010;31:48880-8

DAVIDSON L. A., KELLER R., DESIMONE D. W. Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix during gastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* 2004;231:888-95

DICKER K. T., GURSKI L. A., PRADHAN-BHATT S., WITT R. L., FARACH-CARSON M. C., JIA X. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater* 2014;10:1558-70

DURBEEJ M. Laminins. *Cell Tissue Res* 2010;339:259-68

ELLIOT M. J., DE COPPI P., SPEGGIORIN S., ROEBUCK D., BUTLER C. R., SAMUEL E., CROWLEY C., MCLAREN C., FIERENS A., VONDRYS D., COCHRANE L., JEPHSON C., JANES S., BEAUMONT N. J., COGAN T., BADER A., SEIFALIAN A. M., HSUAN J. J., LOWDELL M. W., BIRCHALL M. A. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet* 2012;380:994-1000

EXPOSITO J. Y., D'ALESSIO M., SOLURSH M., RAMIREZ F. Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro- α 2(I) collagen. *J Biol Chem* 1992;267:15559-62

FIKRY H., GAWAD S. A., BAHER W. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver injury induced by *Schistosoma mansoni*: A histological study. *Int J Stem Cells* 2016;9:96-106

FLETCHER D. A., MULLINS R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010;463:485-92

FRESE L., DIJKMAN P. E., HOERSTRUP S. P. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. *Transfus Med Hemother* 2016;43:268-74

FU J., WANG D. In situ organ-specific vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2018; in press, corrected proof

GAILIT J., RUOSLAHTI E. Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem* 1988;263:12927-32

GALVEZ B. G., SAMPAOLESI M., BRUNELLI S., COVARELLO D., GAVINA M., ROSSI B., CONSTANTIN G., TORRENTE Y., COSSU G. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol* 2006;174:231-43

GAMBA P. G., CONCONI M. T., LO PICCOLO R., ZARA G., SPINAZZI R., PARNIGOTTO P. P. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatr Surg Int* 2002;18:327-31

GANGJI V., DE MAERTELAER V., HAUZEUR J. P. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone* 2011;49:1005-9

GARRETA E., ORIA R., TARANTINO C., PLA-ROCA M., PRADO P., FERNÁNDEZ-AVILÉS F., CAMPISTOL J. M., SAMITIER J., MONTSERRAT N. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. *Mater Today* 2017;20:166-78

GERMANI A., DI CARLO A., MANGONI A., STRAINO S., GIACINTI C., TURRINI P., BIGLIOLI P., CAPOGROSSI M. C. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *Am J Pathol* 2003;163:1417-28

GILBERT T. W., STOLZ D. B., BIANCANIELLO F., SIMMONS-BYRD A., BADYLAK S. F. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005;26:1431-5

GILBERT T. W., SELLARO T. L., BADYLAK S. F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27:3675-83

GILBERT T. W., STEWART-AKERS A. M., BADYLAK S. F. A quantitative method for evaluating the degradation of biologic scaffold materials. *Biomaterials* 2007;28:147-50

GILBERT T. W., FREUND J. M., BADYLAK S. F. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res* 2009;152:135-9

GILBERT-HONICK J., IVER S. R., SOMERS S. M., LOVERING R. M., WAGNER K., MAO Q., GRAYSON W. L. Engineering functional and histological regeneration of vascularized skeletal muscle. *Biomaterials* 2018;164:70-9

GILLIES A. R., SMITH L. R., LIEBER R. L., VARGHESE S. Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17:383-9

GILPIN S. E., GUYETTE J. P., GONZALEZ G., REN X., ASAR J. M., MATHISEN D. J., VACANTI J. P., OTT H. C. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: Bringing the matrix to clinical scale. *J Heart Lung Transplant* 2014;33:298-308

GODBEY W. T., HINDY S.B., SHERMAN M. E., ATALA A. A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffold. *Biomaterials* 2004;25:2799-805

GRASMAN J. M., ZAYAS M. J., PAGE R. L., PINS G. D. Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta Biomater* 2015;25:2-15

GRAUSS R. W., HAZEKAMP M. G., VAN VLIET S., GITTENBERGER-DE GROOT A. C., DERUITER M. C. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:2003-10

GRAUSS R. W., HAZEKAMP M. G., OPPENHUIZEN F., VAN MUNSTEREN C. J., GITTENBERGER-DE GROOT A. C., DERUITER M. C. Histological evaluation of decellularized porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularization methods. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:566-71

GUAN Y., LIU S., SUN C., CHENG G., KONG F., LUAN Y., XIE X., ZHAO S., ZHANG D., WANG J., LI K., LIU Y. The effective bioengineering method of implantation decellularized renal extracellular matrix scaffolds. *Oncotarget* 2015;6:36126-38

HALLMANN R., HORN N., SELG M., WENDLER O., PAUSCH F., SOROKIN L. M. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005;85:979-1000

HARMEY J. H. VEGF and Cancer. New York: Kluwer Academic, 2004. ISBN 0306479885

HILL R. C., CALLE E. A., DZIECIATKOWSKA M., NIKLASON L. E., HANSEN K. C. Quantification of extracellular matrix proteins from a rat lung scaffold to provide a molecular readout for tissue engineering. *Mol Cell Proteomics* 2015;14:961-73

HODDE J. P., BADYLAK S. F., BRIGHTMAN A. O., VOYTIK-HARBIN S. L. Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement. *Tissue Eng* 1996;2:209-17

HREBÍKOVÁ H., VOBORNÍKOVÁ M., HETEŠOVÁ M., MOKRÝ J. Histological evaluation of decellularized skeletal muscle tissue using two different decellularization agents. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2016;59:107-12

HREBÍKOVÁ H., BEZNOSKA P., BEZROUK A., CHVÁTALOVÁ J., PISAL R., MOKRÝ J. Decellularized skeletal muscle: a promising biologic scaffold for tissue engineering. *J Biomater Tissue Eng* 2017;7:491-8

HURD S. A., BHATTI N. M., WALKER A. M., KASUKONIS B. M., WOLCHOK J. C. Development of a biological scaffold engineered using the extracellular matrix secreted by skeletal muscle cells. *Biomaterials* 2015;49:9-17

HUSSEY G. S., CRAMER M. C., BADYLAK S. F. Extracellular matrix bioscaffolds for building gastrointestinal tissue. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018;5:1-13

HYNES R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673-87

CHANG C. H., KUO T. F., LIN C. C., CHOU C. H., CHEN K. H., LIN F. N., LIU H. C. Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold: A porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks. *Biomaterials* 2006;27:1876-88

CHARGE S. B., RUDNICKI M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209-38

CHIORAN A., DUNCAN S., CATALANO A., BROWN T. J., RINGUETTE M. J. Collagen IV trafficking: the inside-out and beyond story. *Dev Biol* 2017;431:124-33

ICHIM T. E., ALEXANDRESCU D. T., SOLANO F., LARA F., CAMPION RDE N., PARIS E., WOODS E. J., MURPHY M. P., DASANU C. A., PATEL A. N., MARLEAU A.M., LEAL A., RIORDAN N. H. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol* 2010;260:75-82

IORIO V., TROUGHTON L. D., HAMILL K. J. Laminins: roles and utility in wound repair. *Adv Wound Care* 2015;4:250-63

ITO A., HAYASHIDA M., HONDA H., HATA K., KAGAMI H., UEDA M., KOBAYASHI T. Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng* 2004;10:873-80

JONES D. L., WAGERS A. J. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:11-21

JUHAS M., BURSAC N. Engineering skeletal muscle repair. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:880-6

KALLURI R. Basement membranes: structures, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2013;3:422-33

KAMAO H., MANDAI M., OKAMOTO S., SAKAI N., SUGA A., SUGITA S., KIRYU J., TAKAHASHI M. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports* 2014;2:205-18

KANG D. W., SHIN S. C., JANG J. Y., PARK H. Y., LEE J. C., WANG S. G., LEE B. J. Decellularization of human nasal septal cartilage for the novel filler material of vocal fold augmentation. *J Voice* 2017;31:127e1-e6

KANG S. B., OLSON J. L., ATALA A., YOO J. J. Functional recovery of completely denervated muscle: implications for innervation of tissue-engineered muscle. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1912-20

- KAWADA H., FUJITA J., KINIO K., MATSUZAKI Y., TSUMA M., MIYATAKE H., MUGURUMA Y., TSUBOI K., ITABASHI Y., IKEDA Y., OGAWA S., OKANO H., HOTTA T., ANDO K., FUKUDA K. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104:358-7
- KEANE T. J., SWINEHART I. T., BADYLAK S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods* 2015;84:25-34
- KLEBE R. J. Cell attachment to collagen: the requirement for energy. *J Cell Physiol* 1975;86:231-6
- KLIMENT C. R., ENGLERT J. M., CRUM L. P., OURY T. D. A novel method for accurate collagen and biochemical assessment of pulmonary tissue utilizing one animal. *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4:349-55
- KREJSEK J., KOPECKÝ O. Klinická imunologie. Nucleus HK 2004. ISBN 80-86225-50-X
- KURATA K., NOMURA S., TAKAMATSU H. Three-dimensional analysis of irreversible electroporation: Estimation of thermal and non-thermal damage. *Intl J Heat Mass Transf* 2014;72:66-74
- LAREU R. R., ZEUGOLIS D. I., ABU-RUB M., PANDIT A., RAGHUNATH M. Essential modification of the sircol collagen assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions. *Acta Biomater* 2010;6:3146-51
- LATTOUF R., YOUNES R., LUTOMSKI D., NAAMAN N., GODEAU G., SENNI K., CHANGOTADE S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem* 2014;62:751-8
- LAVASANI M., LU A., THOMPSON S. D., ROBBINSON P. D., HUARD J., NIEDERNHOFER L. J. Isolation of muscle-derived stem/progenitor cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces. *Methods Mol Biol* 2013;976:53-65
- LE BLANC K., RASMUSSEN I., SUNDBERG B., GÖTHERSTRÖM C., HASSAN M., UZUNEL M., RINGDÉN O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-41
- LEA R. G., AMEZAGA M. R., LOUP B., MANDON-PEPIN B., STEFANSDOTTIR A., FILIS P., KYLE C., ZHANG Z., ALLEN C., PURDIE L., JOUNEAU L., COTINOT C.,

- RHIND M. S., SINCLAIR K. D., FOWLER P. A. The fetal ovary exhibits temporal sensitivity to a 'real-life' mixture of environmental chemicals. *Sci Rep* 2016;6:1-13
- LEE R. C., KOLODNEY M. S. Electrical injury mechanisms - electrical breakdown of cell-Membranes. *Plast Reconstr Surg* 1987;80:672-9
- LEE R. C. Cell injury by electric forces. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1066:85-91
- LEES J. G., LIM S. A., CROLL T., WILLIAMS G., LUI S., COOPER-WHITE J., MCQUADE L. R., MATHIYALAGAN B., TUCH B. E. Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of surrogate tissue and teratoma-forming potential. *Regen Med* 2007;2:289-300
- LI J., ZHOU L., TRAN H. T., CHEN Y., NGUYEN N. E., KARASEK M. A., MARINKOVICH M. P. Overexpression of laminin-8 in human dermal microvascular endothelial cells promotes angiogenesis-related functions. *J Invest Dermatol* 2006;126:432-40
- LI M., ZHANG C., CHENG M., GU Q., ZHAO J. Small intestinal submucosa: A potential osteoinductive biomaterial for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 75:149-56
- LI S., HARRISON D., CARBONETTO S., FASSLER R., SMYTH N., EDGAR D., YURCHENCO P.D. Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol* 2002;157:1279-90
- LI Y., ZHU Y., YU H., CHEN L., LIU Y. Topographic characterization and protein quantification of esophageal basement membrane for scaffold design reference in tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012;100:265-73
- LIN C. H., YANG J. R., CHIANG N. J., MA H., TSAY R. Y. Evaluation of decellularized extracellular matrix of skeletal muscle for tissue engineering. *Int J Artif Organs* 2014;37:546-55
- LIN Q., WONG L. H., TIAN F. R. HUANG Y. D., XU J., YANG J. J., CHEN P. P., FAN Z. L., LU C. T., ZHAO Y. Z. Enhanced neuroprotection with decellularized brain extracellular matrix containing bFGF after intracerebral transplantation in Parkinson's disease rat model. *Int J Pharm* 2017;517:383-94

LINDQVIST J. TORVALDSON E., GULLMETS J., KARVONEN H., NAGY A., TAIMEN P., ERIKSSON J. E. Nestin contributes to skeletal muscle homeostasis and regeneration. *J Cell Sci* 2017;130:2833-42

LIU J., ZHOU H., WEIR M. D., XU H. H., CHEN Q., TROTMAN C. A. Fast-degradable microbeads encapsulating human umbilical cord stem cells in alginate for muscle tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2012;18:2303-14

LIU Y., YAN X., SUN Z., CHEN B., HAN Q., LI J., ZHAO R. C. Flk-1(+) adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev* 2007;16:695-706

LOVETT M., LEE K., EDWARDS A., KAPLAN D. A. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2009;15:353-70

LU D., CHEN B., LIANG Z., DENG W., JIANG Y., LI S., XU J., WU Q., ZHANG Z., XIE B., CHEN S. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;92:26-36

LU T. Y., LIN B., KIM J., SULLIVAN M., TOBITA K., SALAMA G., YANG L. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nat Commun* 2013;4:2307-18

LUMPKINS S. B., PIERRE N., MCFETRIDGE P. S. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta Biomater* 2008;4:808-16

LUO L., ESWARAMOORTHY R., MULHALL K. J., KELLY D. J. Decellularization of porcine articular cartilage explants and their subsequent repopulation with human chondroprogenitor cells. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;55:21-31

MACCHIARINI P., JUNGEBLUTH P., GO T., ASNAGHI M. A., REES L. E., COGAN T. A., DODSON A., MARTORELL J., BELLINI S., PARNIGOTTO P. P., DICKINSON S. C., HOLLANDER A. P., MANTERO S., CONCONI M. T., BIRCHALL M. A. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008;372:2023-30

MAHERALI N., SRIDHARAN R., XIE W., UTIKAL J., EMINLI S., ARNOLD K., STADTFED M., YACHECHKO R., TCHIEU J., JAENISCH R., PLATH K.,

HOCHEDLINGER K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007;1:55-70

MATSUI T., RAYA A., CALLOL-MASSOT C., KAWAKAMI Y., OISHI I., RODRIGUEZ-ESTEBAN C., IZPISÚA BELMONTE J. C. Miles-apart-mediated regulation of cell-fibronectin interaction and myocardial migration in zebrafish. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4:77-82

MCCULLAGH K. J. A., PERLINGEIRO R. C. R. Coaxing stem cells for skeletal muscle repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;84:198-207

MENASCHÉ P., VANNEAUX V., HAGÉGE A., BEL A., CHOLLEY B., PAROUCHEV A., CACCIAPUOTI I., AL-DACCAK R., BENHAMOUDA N., BLONS H., AGBULUT O., TOSCA L., TROUVIN J. H., FABREQUETTES J. R., BELLAMY V., CHARRON D., TARTOUR E., TACHDIJIAN G., DESNOS M., LARGHERO J. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors for severe ischemic left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:429-38

MENASCHÉ P., VANNEAUX V., HAGÉGE A., BEL A., CHOLLEY B., CACCIAPUOTI I., PAROUCHEV A., BENHAMOUDA N., TACHDIJIAN G., TOSCA L., TROUVIN J. H., FABREQUETTES J. R., BELLAMY V., GUILLEMAIN R., SUBERBIELE BOISSEL C., TARTOUR E., DESNOS M., LARGHERO J. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* 2015;36:2011-7

MENG F. W., SLIVKA P. F., DEARTH C. L., BADYLAK S. F. Solubilized extracellular matrix from brain and urinary bladder elicits distinct functional and phenotypic responses in macrophages. *Biomaterials* 2015;46:131-40

MENON N. G., RODRIGUEZ E. D., BYRNES C. K., GIROTTO J. A., GOLDBERG N. H., SILVERMAN R. P. Revascularization of human acellular dermis in full-thickness abdominal wall reconstruction in the rabbit model. *Ann Plast Surg* 2003;50:523-7

MERRITT E. K., HAMMERS D. W., TIERNEY M., SUGGS L. J., WALTERS T. J., FARRAR R. P. Functional assessment of skeletal muscle regeneration utilizing homologous extracellular matrix as a scaffolding. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1395-405

- MERLY F., LESCAUDRON L., ROUAUD T., CROSSIN F., GARDAHAUT M. F. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 1999;22:724-32
- MIERMONT A., WAHARTE F., HU S., MCCLEAN M. N., BOTTANI S., LÉON S., HERSEN P. Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:5725-30
- MINASI M. G., RIMINUCCI M., DE ANGELIS L., BORELLO U., BERARDUCCI B., INNOCENZI A., CAPRIOLI A., SIRABELLA D., BAIOCCHI M., DE MARIA R., BORATTO R., JAFFREDO T., BROCCOLI V., BIANCO P., COSSU G. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 2002;129:2773-84
- MOLLER S., WEISSER J., BISCHOFF S., SCHNABELRAUCH M. Dextran and hyaluronan methacrylate based hydrogels as matrices for soft tissue reconstruction. *Biomol Eng* 2007;24:496-504
- MOORE M. A., SAMSELL B., WALLIS G., TRIPLETT S., CHEN S., JONES A. L., QIN X. Decellularization of human dermis using non-denaturing anionic detergent and endonuclease: a review. *Cell Tissue Bank* 2015;16:249-59
- MORETTI F. A., CHAUHAN A. K., IACONCIG A., PORRO F., BARALLE F. E., MURO A. F. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J Biol Chem* 2007;282:28057-62
- MURRY C. E., KELLER G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: Lessons from embryonic development. *Cell* 2008;132:661-80
- MUZZARELLI R. A., GRECO F., BUSILACCHI A., SOLLAZZO V., GIGANTE A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydr Polym* 2012;89:723-39
- MYERS D. Surfactant Science and Technology. Edition ed.: Wiley 2005. ISBN 9780471746072
- NAGATA S., HANAYAMA R., KAWANE K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 2010;140:619-30

NISSAR A. A., MARTOWIROGO A., GILBERT P. M. Targeting the stem cell niche with regenerative biomaterials. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2016;20:180-92

NONAKA P. N., URIARTE J. J., CAMPILLO N., MELO E., NAVAJAS D., FARRÉ R., OLIVIERA L. V. Mechanical properties of mouse lungs along organ decellularization by sodium dodecyl sulfate. *Respir Physiol Neurobiol* 2014;200:1-5

NUSSBAUM J. E., MINAMI E., LAFLAMME M. A., VIRAG J. A., WARE C. B., MASINO A., MUSKHELI V., PABON L., REINECKE H., MURRY C. E. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 2007;21:1345-57

OCHOA O., SUN D., REYES-REYNA S. M., WAITE L. L., MICHALEK J. E., MCMANUS L. M., SHIREMAN P. K. Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2^{-/-} mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R651-61

OTT C. H., MATTHIESEN T. S., BLACK L. D., KREN S. K., NETOFF T. I., TAYLOR D. A. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008;14:213-21

PANKOV R., YAMADA K. M. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002;115: 3861-3

PARK J., LI Y., BERTHIAUME F., TONER M., YARMUSH M. L., TILLES A. W. Radial flow hepatocyte bioreactor using stacked microfabricated grooved substrates. *Biotechnol Bioeng* 2008;99:455-67

PATARIDIS S., ECKHARDT A., MIKULIKOVA K., SEDLAKOVA P., MIKSIKI. Determination and quantification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS. *Curr Anal Chem* 2009;5:316-23

PÉAULT B., RUDNICKI M., TORRENTE Y., COSSU G., TREMBALY J. P., PARTRIDGE T., GUSSONI E., KUNKEL L. M., HUARD J. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 2007;15:867-77

PETERSEN T. H., CALLE E. A., ZHAO L., LEE E. J., GUI L., RAREDON M. B., GAVRILOV K., YI T., ZHUANG Z. W., BREUER C., HERZOG E., NIKLASON L. E. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science* 2010;329:538-41

PERISSINOTTO D., IACOPETTI P., BELLINA I., DOLIANA R., COLOMBATTI A., PETTWAY Z., BRONNER-FRASER M., SHINOMURA T., KIMATA K., MÖRGELIN M., LÖFBERG J., PERRIS R. Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/versican and aggrecan. *Development* 2000;127:2823-42

PISAL R. V., SUCHÁNEK J., SILLER R., SOUKUP T., HREBÍKOVÁ H., BEZROUK A., KUNKE D., MIČUDA S., FILIP S., SULLIVAN G., MOKRÝ J. Directed reprogramming of comprehensively characterized dental pulp stem cells extracted from natal tooth. *Sci Rep* 2018; přijato k tisku

PORZIONATO A., SFRISO M. M., PONTINI A., MACCHI V., PETRELLI L., PAVAN P. G., NATALI A. N., BASSETTO F., VINDIGNI V., DE CARO R. Decellularized human skeletal muscle as biologic scaffold for reconstructive surgery. *Int J Mol Sci* 2015;16:14808-31

PÖSCHL E., SCHLÖTZER-SCHREHARDT U. BRACHVOGEL B., SAITO K., NINOMIYA Y., MAYER U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 2004;131:1619-28

PRASAD V. K., LUCAS K. G., KLEINER G. I., TALANO J. A., JACOBSON D., BROADWATER G., MONROY R., KURTZBERG J. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:534-41

QAZI T. H., MOONEY D. J., PUMBERGER M., GEISLER S., DUDA G. N. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends. *Biomaterials* 2015;53:502-21

QING Q., QIN T. Optimal method for rat skeletal muscle decellularization. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2009;23:836-9

QU-PETERSEN Z., DEASY B., JANKOWSKI R., IKEZAWA M., CUMMINS J., PRUCHNIC R., MYTINGER J., CAO B., GATES C., WERNING A., HUARD J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002;157:851-64

RANA D., ZREIGAT H., BENKIRANE-JESSEL N., RAMAKRISHNA S., RAMALINGAM M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2015;11:945-62

RASPANTI M., REGUZZONI M., PROTASONI M., BASSO P. Not only tendos: The other architecture of collagen fibrils. *Int J Biol Macromol* 2018;10:1668-74

REING J. E., ZHANG L., MYERS-IRVIN J., CORDERO K. E., FREYTES D. O., HEBER-KATZ E., BEDELBAEVA K., MCINTOSH D., DEWILDE A., BRAUNHUT S. J., BADYLAK S. F. Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation. *Tissue Eng Part A* 2009;15:605-14

REING J. E., BROWN B. N., DALY K. A., FREUND J. M., GILBERT T. W., HSIONG S. X., HUBER A., KULLAS K. E., TOTTEY S., WOLF M. T., BADYLAK S. F. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 2010;31:8626-33

RIEDERER I., BONOMO A. C., MOULY V., SAVINO W. Laminin therapy for the promotion of muscle regeneration. *FEBS Lett* 2015;589:3449-53

ROBERTSON M. J., DRIES-DEVLIN J. L., KREN S. M., BURCHFIELD J. S., TAYLOR D. A. Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. *PloS One* 2014;9:e90406

ROBERTS T. S., DREZ D., MCCARTHY W., PAINE R. Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts - 2 year results in 36 patients. *Am J Sports Med* 1991;19:35-41

ROSS, M. H. AND W. PAWLINA Histology: a text and atlas : with correlated cell and molecular biology. Edition ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2011. ISBN 978-1-4511-0150-8

ROSSI C. A., FLAIBANI M., BLAAUW B., POZZOBON M., FIGALLO E., REGGIANI C., VITIELLO L., ELVASSORE N., DE COPPI P. In vivo tissue engineering of functional skeletal muscle by freshly isolated satellite cells embedded in a photopolymerizable hydrogel. *FASEB J* 2011;25:2296-304

ROUGER K., LARCHER T., DUBREIL L., DESCHAMPS J. Y., LE GUINER C., JOUVION G., DELORME B., LIEUBEAU B., CARLUS M., FORNASSARI B., THERET M., ORLANDO P., LEDEVIN M., ZUBER C., LEROUX I., DELEAU S., GUIGAND L.,

TESTAULT I., LE RUMEUR E., FISZMAN M., CHÉREL Y. Systemic delivery of allogenic muscle stem cells induces long-term muscle repair and clinical efficacy in duchenne muscular dystrophy dogs. *Am J Pathol* 2011;179:2501-18

ROZARIO T., DESIMONE D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* 2010;341:126-40

SAMBASIVAN R., TAJBAKHS S. Adult skeletal muscle stem cells. *Results Probl Cell Differ* 2015;56:191-213

SAMPAOLESI M., TORRENTE Y., INNOCENZI A., TONIORENTI R., D'ANTONA G., PELLEGRINO M. A., BARRESI R., BRESOLIN N., DE ANGELIS M. G., CAMPBELL K. P., BOTTINELLI R., COSSU G. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 2003;301:487-92

SAMPAOLESI M., BLOT S., D'ANTONA G., GRANGER N., TONLORENZI R., INNOCENZI A., MOGNOL P., THIBAUD J. L., GALVEZ B. G., BARTHÉLÉMY I., PERANI L., MANTERO S., GUTTINGER M., PANSARASA O., RINALDI C., DE ANGELIS M. G., TORRENTE Y., BORDIGNON C., BOTTINELLI R., COSSU G. Corrigendum: Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006;494:574-9

SASSOLI C., PINI A., CHELLINI F., MAZZANTI B., NISTRI S., NOSI D., SACCARDI R., QUERCIOI F., ZECCHI-ORLANDINI S., FORMIGLI L. Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF. *Plos One* 2012;7:e37512

SEDDON A. M., CURNOW P., BOOTH P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* 2004;1666:105-17

SEHN L. H., ALYEA E. P., WELLER E., CANNING C., LEE S., RITZ J., ANTIN J. H., SOIFFER R. J. Comparative outcomes of T-cell-depleted and non-T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: impact of donor lymphocyte infusion. *J Clin Oncol* 1999;17:561-8

SHELTON M., KOCHARYAN A., LIU J., SKERJANC I. S., STANFORD W. L. Robust generation and expansion of skeletal muscle progenitors and myocytes from human pluripotent stem cells. *Methods* 2016;101:73-84

SHER S. E., HULL B. E., ROSEN S., CHURCH D., FRIEDMAN L., BELL E. Acceptance of allogeneic fibroblasts in skin equivalent transplants. *Transplantation* 1983;36:552-7

SHIMIZU K., ITO A., ARINOBE M., MURASE Y., IWATA Y., NARITA Y., KAGAMI H., UEDA M., HONDA H. Effective cell-seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2007;103:472-8

SHOULDERS M. D., RAINES R. T. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009;78:929-58

SCHMITT T., FOX P. M., WOON C. Y., FARNEBO S. J., BEHN A., PHAM H., CHANG J. Human flexor tendon tissue engineering: in vivo effects of stem cell reseeded. *Plast Reconstr Surg* 2013;567-76

SCHULTZ G. S., WYSOCKI A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 2009;17:153-62

SICARI B. M., DZIKI J. L., SIU B. F., MEDBERRY C. J., DEARTH C. L., BADYLAK S. F. The promotion of a constructive macrophage phenotype by solubilized extracellular matrix. *Biomaterials* 2014;35:8605-12

SILVA A. C., RODRIGUES S. C., CALDEIRA J., NUNES A. M., SAMPAIO-PINTO V., RESENDE T. P., OLIVEIRA M. J., BARBOSA M. A., THORSTEINSDÓTTIR S., NASCIMENTO D. S., PINTO-DO-Ó P. Three-dimensional scaffolds of fetal decellularized hearts exhibit enhanced potential to support cardiac cells in comparison to the adult. *Biomaterials* 2016;104:52-64

SIMON T., BROMBER J. S. Regulation of the immune system by laminins. *Trends Immunol* 2017;38:858-71

STADMILLER S. S., GORENSEK-BENITEZ A. H., GUSEMAN A. J., PIELAK G. J. Osmotic shock induced protein destabilization in living cells and its reversal by glycine betaine. *J Mol Biol* 2017;429:1155-61

STRAUER B. E., BREHM M., ZEUS T., KÖSTERING M., HERNANDEZ A., SORG R. V., KÖGLER G., WERNET P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;8:1913-8

STUDELSKA D. R., GILJUM K., MCDOWELL L. M., ZHANG L. Quantification of glycosaminoglycans by reversed-phase HPLC separation of fluorescent isoindole derivatives. *Glycobiology* 2006;16:65-72

SU Z., MA H., WU Z. ZENG H., LI Z., WANG Y., LIU G., XU B., LIN Y., ZHANG P., WEI X. Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014;44:440-8

SULLIVAN D. C., MIRMALEK-SANI S. H., DEEGAN D. B., BAPTISTA P. M., ABOUSHWAREB T., ATALA A., YOO J. J. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials* 2012;33:7756-64

TAKAHASHI K., YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76

TAYLOR S. C., BERKELMAN T., YADAV G., HAMMOND M. A Defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Mol Biotechnol* 2013;55:217-26

THEOCHARIS A. D., SKANDALIS S. S., GIALELI C., KARAMANOS N. K. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;97:4-27

TIDBALL J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 1995;27:1022-32

TIDBALL J. G., DORSHKIND K., WEHLING-HENRICKS M. Shared signaling systems in myeloid cell-mediated muscle regeneration. *Development* 2014;141:1184-96

TOEG H. D., TIWARI-PANDEY R., SEYMOUR R., AHMADI A., CROWE S., VULESEVIC B., SUURONEN E. J., RUEL M. Injectable small intestine submucosal extracellular matrix in an acute myocardial infarction model. *Ann Thorac Surg* 2013;96:1686-94

TOTTEY S., CORSELLI M., JEFFRIES E. M., LONDONO R., PEAULT B., BADYLAK S. F. Extracellular matrix degradation products and low-oxygen conditions enhance the regenerative potential of perivascular stem cells. *Tissue Eng Part A* 2011a;17:37-44

TOTTEY S., JOHNSON S. A., CRAPO P. M., REING J. E., ZHANG L., JIANG H., MEDBERRY C. J., REINES B., BADYLAK S. F. The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *Biomaterials* 2011b;32:128-36

TRINH L. A., STAINIER D. Y. Fibronectin regulates epithelial organization during myocardial migration in zebrafish. *Dev Cell* 2004;6:371-82

TURNER N. J., YATES A. J., WEBER D. J., QURESHI I. R., STOLZ D. B., GILBERT T. W., BADYLAK S. F. Xenogeneic extracellular matrix as an inductive scaffold for regeneration of a functioning musculotendinous junction. *Tissue Eng Part A* 2010;16:3309-17

URCIOLO A., QUARTA M., MORBIDONI V., GATTAZO F., MOLON S., GRUMATI P., MONTEMURRO F., TEDESCO F. S., BLAAUW B., COSSU G., VOZZI G., RANDO T. A., BONALDO P. Collagen type VI regulates satellite cells self-renewal and muscle regeneration. *Nat Commun* 2013;4:1964

USAS A., HUARD J. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials* 2007;28:5401-6

UYGUN B. E., SOTO-GUTIERREZ A., YAGI H., IZAMIS M. L., GUZZARDI M. A., SHULMAN C., MILWID J., KOBAYASHI N., TILLES A., BERTHIAUME F., HERTL M., NAHMIAS Y., YARMUSH M. L., UYGUN K. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* 2010;16:814-20

VALENTIN J. E., STEWART-AKERS A. M., GILBERT T. W., BADYLAK S. F. Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2009;15:1687-94

VALENTIN J. E., TURNER N. J., GILBERT T. W., BADYLAK S. F. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials* 2010;31:7475-84

VUNJAK-NOVAKOVIC G., TANDON N., GODIER A., MAIDHOF R., MARSANO A., MARTENS T. P., RADISIC M. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:169-87

WANG R. M., JOHNSON T. D., HE J., RONG Z., WONG M., NIGAM V., BEHFAR A., XU Y., CHRISTMAN K. L. Humanized mouse model for assessing the human immuner response to xenogeneic and allogeneic decellularized biomaterials. *Biomaterials* 2017;129:98-110

WANG S., WANG Y., SONG L., CHEN J., MA Y., FAN S., SU M., LIN X. Decellularized tendon as a prospective scaffold for tendon repair. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 77:1290-1301

WASSENAAR J. W., BOSS G. R., CHRISTMAN K. L. Decellularized skeletal muscle as an in vitro model for studying drug-extracellular matrix interactions. *Biomaterials* 2015;64:108-14

WHITE L. J., TAYLOR A. J., FAULK D. M., KEANE T. J., SALDIN L. T., REING J. E., SWINEHART I. T., TURNER N. J., RATNER B. D., BADYLAK S. F. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. *Acta Biomater* 2017;50:207-19

WOODS T., GRATZER P. F. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials* 2005;26:7339-49

WU X., WANG S., CHEN B., AN X. Muscle-derived stem cells: isolation, characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Cell Tissue Res* 2010;340:549-67

YANG B., ZHANG Y., ZHOU L., SUN Z., ZHENG J., CHEN Y., DAI Y. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:1201-11

YAU J. W., TEOH H., VERMA S. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord* 2015;15:130

ZAMMIT P. S., Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2017;72:19-32

ZHANG J., HU Q., TURNER N. J., TENG S. F., CHENG W. Y., ZHOU H. Y., ZHANG L., HU W., WANG Q., BADYLAK S. F. Perfusion-decellularized skeletal muscle as a three-dimensional scaffold with a vascular network template. *Biomaterials* 2016;89:114-26

ZHENG M. H., CHEN J., KIRILAK Y., WILLERS C., XU J., WOOD D. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;73: 61-7

ZHOU J., FRITZE O., SCHLEICHER M., WENDEL H. P., SCHENKE-LAYLAND K., HARASZTOSI C., HU S., STOCK U. A. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials* 2010;31:2549-54

ZHOU J., HU S., DING J., XU J., SHI J., DONG N. Tissue engineering of heart valves: PEGylation of decellularized porcine aortic valve as a scaffold for in vitro recellularization. *Biomed Eng Online* 2013;12:87